

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR-JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
JA
TEHNOLOOGIAINSTITUUT

Oksana Gerulis

**Melanoomi antigeeni türosinaasi vastase antikeha
internaliseerumismehhanismide uurimine**

Magistritöö

(30 EAP)

Juhendaja: Nele Jaanson, MSc

TARTU 2016

Melanoomi antigeeni türosinaasi vastase antikeha internaliseerumismehhanismide uurimine

Lühikokkuvõte:

Vähkkasvajad on üks sagedasemaid surma põhjusi. Nende seas on olulisel kohal nahakasvaja liik – melanoom. Probleemiks on melanoomi haigestumise kiire kasv ja spetsiifilise ning tõhusa mõjuga ravi puudumine. Seetõttu otsitakse uusi võimalusi melanoomi raviks.

Tänapäeval on monoklonaalsed antikehad kõige edukam bioloogilise teraapia klass, kus püütakse luua aina spetsiifilisemaid antikehi, mis oleksid võimelised peatama vähirakkude kasvu. Terapeutilised monoklonaalsed antikehad mõjutavad otse oma sihtmärke või võivad olla kasutatud immunkonjugaatidena tsütotoksilise ainega, mis viiakse tänu antikehale spetsiifiliselt vähirakkudesse, jättes kiiresti paljunevad normaalsed koed kahjustamata.

5A2 antikeha on Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis välja töötatud melanoomispetsiifiline türosinaasi-vastane antikeha, mis on võimeline inhibeerima selle tuumori rakkude proliferatsiooni. Analüüsid näitavad, et ta suudab siseneda melanoomi rakkudesse endotsütootilise mehhanismi kaudu. Tähtsat rolli selles protsessis mängivad FcγRIIB2 retseptorid nende rakkude pinnal. Oletatavasti on seal tegemist mitme erineva protsessiga, kuna sellele avaldasid mõju erinevad inhibiitorid.

Märksõnad: melanoom, antikeha, Fc retseptorid, endotsütoos, türosinaas.

CERCS: B200 Tsütoloogia, onkoloogia, kantseroloogia

Investigation of internalization mechanisms of anti-melanoma antigen tyrosinase antibody

Abstract:

Cancer is one of the leading causes of death. Among tumors especially dangerous is a type of skin cancer – melanoma. The problem is that there is a rapid increase in melanoma incidence and the lack of a specific and effective treatment. Therefore it is important to search for new ways to treat melanoma.

Today, monoclonal antibodies are the most successful class of biological therapeutics. Therapeutic monoclonal antibodies act directly or may be used as immunoconjugates with cytotoxic agent, which will be specifically transported into cancer cells, without harming rapidly proliferating normal cells.

5A2 melanoma-specific anti-tyrosinase antibody was developed in the Institute of Technology, University of Tartu. This mAb is able to inhibit the tumor cell proliferation. Analyses show that it is capable to enter the melanoma cells by endocytic mechanism. The presence of Fc γ RIIB2 plays an important role in this process. Presumably, there is a number of different pathways, because the internalization of this mAb was influenced by several inhibitors.

Keywords: melanoma, antibody, Fc receptor, endocytosis, tyrosinase.

CERCS: B200 Cytology, oncology, cancerology

Sisukord

Sissejuhatus	6
Kasutatud lühendid.....	8
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	10
1.1. Türosinaas	10
1.2. Melanoom.....	11
1.3. Antikehad	15
1.3.1. Immunoglobuliin G	17
1.3.1.1. 5A2 antikeha.....	18
1.4. Fc retseptorid.....	18
1.4.1. Tüüp I retseptorid	18
1.5. Endotsütoos	22
1.5.1. Klatriin - vahendatud endotsütoos.....	23
1.5.2. Kaveoolide-vahendatud endotsütoos	24
1.5.3. Makropinotsütoos	25
1.5.4. Klatriinist- ja kaveoolidest- sõltumatu endotsütoos	25
1.5.5. Inhibiitorid.....	25
1.6. Gaussia Lutsiferaas.....	26
2. EKSPERIMENTAALNE OSA.....	28
2.1. Materjalid ja meetodid.....	28
2.1.1. Western blot mitte-vereloomelise päritoluga rakuliinidega	28
2.1.2. Inimese FCGR1B ekspresseeriva plasmidi loomine	29
2.1.3. Western blot elektroporeeritud COS-7 rakkudega	29
2.1.4. Antikehad	29
2.1.4.1. 5A2 antikeha paljundamine ja puhastamine	29
2.1.4.2. 5A2-Gluc antikeha.....	30
2.1.5. Rakkude kasvatamine.....	30
2.1.6. Elektroporatsioon	30
2.1.7. Internalisatsiooni katse immuonofluorestsents-märgisega antikehadega.....	31
2.1.8. Internalisatsiooni katse 5A2-GLuc antikehaga.....	31
2.1.8.1. Internalisatsiooni katse COS-7 rakkudega 37°C juures	31
2.1.8.2. Internalisatsiooni katse COS-7 rakkudega 4°C juures	32
2.1.8.3. Internalisatsiooni katse B16F0 rakkudega 37°C juures.....	32
2.1.8.4. Internalisatsiooni katse B16F0 rakkudega 4°C juures.....	32

2.1.8.5. Internalisatsiooni katse COS-7 rakkudega 4°C juures kasutades inhibiitoreid	32
2.1.8.6. Internalisatsiooni katse B16F0 rakkudega 4°C juures kasutades inhibiitoreid.	33
2.1.9. Statistiline analüüs.....	33
2.1.10. <i>In vivo</i> internalisatsiooni katse fluorestsents-märgistatud antikehaga.....	33
2.3. Tulemused	34
2.3.1. Melanoomi rakuliinid ekspresseerivad FcγRIIB retseptorit ja türosinaasi.....	34
2.3.2. Ekspressioonikonstruktide kontroll COS-7 rakkudes	35
2.3.3. 5A2 antikeha on võimeline rakkudesse sisenema	36
2.3.4. 5A2 internalisatsiooni sõltuvus FcγRIIB2 retseptorist, türosinaasist või nende koossekspressioonist	40
2.3.5. 5A2 antikeha siseneb rakkudesse endotsütoosi teel	41
2.3.6. Inhibiitorite mõju 5A2 antikeha internalisatsioonile	43
2.3.7. FcγRIIB2 ja türosinaasi olemasolul internaliseerunud 5A2 mAb ei lähe lüsoosoomidesse.....	45
2.4. Arutelu.....	48
KOKKUVÕTE.....	51
Summary	52
Tänuavaldused.....	53
Kasutatud kirjanduse loetelu	54
LISAD	63
LISA 1	63
LISA 2	64
Lihtlitsents	65

Sissejuhatus

Melanoom on pahaloomulise nahakasvaja liik, mis tekib melanotsüütidest. Viimase kahekümne aasta jooksul on sellesse haigestumine kahekordistunud. Varajases arengustaadiumis on see kirurgiliselt efektiivselt ravitav, kuid siirete korral on see praktiliselt ravimatu.

Tänapäeval on monoklonaalsed antikehad kõige edukam bioloogilise teraapia klass, kus püütakse luua aina spetsiifilisemaid antikehi, mis oleksid võimelised peatama vähirakkude kasvu. Monoklonaalseid antikehi kasutatakse rutiinselt vähi-vastases teraapias, kus nad asendavad mittespetsiifilisi tsütotoksiine (Ehrlich, 1906). Terapeutilised monoklonaalsed antikehad mõjutavad otse oma sihtmärke või võivad olla kasutatud immunokonjugaatidena tsütotoksilise ainega, mis viiakse tänu antikehale spetsiifiliselt vähirakkudesse.

5A2 antikeha on Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis välja töötatud melanoomispetsiifiline türosinaasi-vastane antikeha, mis on võimeline inhibeerima selle tuumori rakkude proliferatsiooni. Samuti on selgunud, et see antikeha on suuteline sisenema melanoomi rakkudesse (artikkel on saadetud publitseerimisele). Konkreetne toimemehhanism on aga siiani teadmata.

Varasematest uuringutest on teada, et paljud tuumorid ekspresseerivad oma pinnal Fc retseptoreid, mis on spetsiifilised transmembraansed glükoproteiinid immuunoglobuliinide sidumiseks. Mõned sellistest kasvajate peal ekspresseeruvatest retseptoritest on inhibitoorsed retseptorid- FcγRIIB retseptorid, milledest üks vorm – FcγRIIB2 – on tugevalt endotsütootiline retseptor. Seda asjaolu arvestades pakkusime välja, et meie antikeha siseneb selle retseptori abil. Kuna aga 5A2 on türosinaasi-vastane antikeha, siis oli meie jaoks tähtis selgeks teha, kuivõrd antikeha sisenemisvõime sõltub mitte ainult FcγRIIB2 retseptori olemasolust, vaid ka türosinaasi või nende mõlema koos-ekspressioonist rakus.

Türosinaas on vaske sisaldav ensüüm, mis vastutab melaniinide (pigmentide) ja teiste polüfenoolsete komponentide moodustumise eest nahas, karvasibulates ja silma koroideas. See on üks peamistest melanotsüütide ehk naha pigmentrakkude antigeenidest, mistõttu kasutatakse seda sihtmärgina melanoomi-vastaste vaktsiinide loomises.

Töö esimeses osas antakse ülevaade türosinaasi kohta, räägitakse antikehadest ja neid seondavatest Fc retseptoridest.

Töö praktiline osa on pühendatud 5A2 antikeha võimele siseneda rakkudesse. Uuriti, kas see protsess on Fc retseptoritest või türosinaasist sõltuv ja millist endotsütoosi rada see hõlmab.

Kasutatud lühendid

ADCC – antikeha-sõltuv rakuline tsütotoksilisus (*antibody dependent cell cytotoxicity*)

BSA - veise seerumi albumiin (*bovine serum albumin*)

CDC – komplement-sõltuv tsütotoksilisus (*complement-dependent cytotoxicity*)

Clp – kloorpromaziin (*chlorpromazine*)

CME – klatriin-vahendatud endotsütoos (*clathrin-mediated endocytosis*)

CvME – kaveoliin-vahendatud endotsütoos (*caveolae-mediated endocytosis*)

CyD – tsütohalasiin D (*cytochalasine D*)

DAPI – 4', 6-diamidino-2-fenüülindool (*4', 6-diamidino-2-phenylindole*)

DCT – dopakroom tautomeraas (*dopachrome tautomerase*)

FCS – veise loote seerum (*fetal calf serum*)

FDA – Toidu- ja ravimiamet (*Food and Drug Administration*)

Ig – immuunoglobuliin (*immunoglobulin*)

mAb – monoklonaalne antikeha (*monoclonal antibody*)

MP – makropinotsütoos (*macropinocytosis*)

NYS – nüstatiin (*nystatine*)

PBS – fosfaatpuhverdatud soolalahus (*phosphate buffered saline*)

PCR - polümeraasi ahelreaktsioon (*polymerase chain reaction*)

PFA – paraformaldehüüd (*paraformaldehyde*)

PI3K – fosfatidüülinositol 3-kinaas (*phosphatidylinositol 3-kinase*)

PVDF – polüvinülideen fluoriid (*polyvinylidene fluoride*)

RLU – relatiivne valgusühik (*relative light unit*)

SDS – naatrium dodetsüül sulfaat (*sodium dodecyl sulfate*)

Tyrp – türosinaasi sugulasvalk (*Tyrosinase-related protein*)

Vort – vortmanniin (*wortmannin*)

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Türosinaas

Türosinaas on transmembranne glükoproteiin, mida ekspresseeritakse spetsiifiliselt melanotsüütides - rakkudes, mis esinevad peamiselt nahas, karvasibulates, silma koroideas (Jimenez, Kameyama *et al.* 1988). Türosinaas (monofenool monooksüdaas; EC 1.14.18.1) on vaske sisaldav ensüüm, mis vastutab melaniinide (pigmentide) (Thomson, Mattes *et al.* 1985) ja teiste polüfenoolsete komponentide moodustumise eest (Hearing, Ekel *et al.* 1978; Hearing, Nicholson *et al.* 1978).

Türosinaasi valgu molekulmass varieerub 55-75 kDa vahel. Türosinaasil on viis N-glükosüleerimissaiti (Fidler 1973; Kwon, Haq *et al.* 1987). Glükosüleerimata translatsiooni produkti molekulmass on umbes 58 kDa, samal ajal kui glükosüleeritud vormil varieerub 60-75 kDa (Hearing, Ekel *et al.* 1981). Nagu ka teiste membraansete glükoproteiinide protsessimine, toimub türosinaasi protsessing endoplasmaatilises retiikulumis spetsiifiliste tsäperoonide ja ensüümide abil (Helenius, 1994).

Pärast translatsiooni transporditakse ebaküps türosinaas Golgi kompleksi, kus ta ühineb kahe vase aatomiga, millega moodustub küpse türosinaasi aktiivsait (Matoba, Kumagai *et al.* 2006).

Türosinaas kuulub omanimelise perekonna valkude hulka, milles on veel lisaks kaks türosinaasi sugulasvalku: dopakroom tautomeraas (*DCT- ingl. dopachrome tautomerase, Tyrp2*) (Aroca, Solano *et al.* 1991) ja gp75 (*Tyrp1 - ingl. tyrosinase related protein 1 – türosinaasiga seotud valk 1*)(del Marmol and Beermann 1996). Kõik need kolm valku on sarnase ehitusega: omavad signaalijärjestust, kaht tsüsteiinirikast ja üht transmembraanset domääni ning lühikest tsütoplasmaatilist C-terminaalset osa. Kõige tähtsam on kahe Cu^{++} või Zn^{++} aatomi seondumissaitide olemasolu, mis vastutavad nende valkude katalüütilise aktiivsuse eest (Olivares and Solano 2009). Nagu ka türosinaas, on kaks ülejäänud valku melanotsüüdi-spetsiifilised, mida ekspresseeritakse enamuses melanosoomides.

Türosinaasi kui melanotsüütide diferentseerumise antigeeni sünteesitakse paljudes metastaatilistes melanoomides, sealhulgas ka mittemelanootilistes kolletes. (Brichard, Van Pel *et al.* 1993; Robbins, el-Gamil *et al.* 1994). See on üks esimestest avastatud melanoomi antigeenidest (Brichard, Van Pel *et al.* 1993). Kuna T tappur-rakud (killerrakud) (Brichard, Van Pel *et al.* 1993; Robbins, el-Gamil *et al.* 1994) ja T abirakud (helperrakud) (Topalian,

Rivoltini *et al.* 1994) tunnevad ära türosinaasi geeni produkti, on suur huvi türosinaasi kasutamiseks potentsiaalse sihtmärgina melanoomi vastastes vaktsiinides (Boon, Cerottini *et al.* 1994; Wolchok, Yuan *et al.* 2007).

1.2. Melanoom

Melanoom on pahaloomuline kasvaja, nahavähi liik (Joonis 1), mis tekib melanotsüütidest ehk naha pigmentrakkudest. Melanotsüüdid produtseerivad melaniini, mis annab nahale tema värvuse ehk pigmendi. Melaniini ülesanne on kaitsta nahka ultraviolet (UV) kiirguse eest. Melanoom võib organismis kiiresti levida ja seetõttu on väga oluline avastada ning ravida seda haigust juba varases staadiumis (<http://www.kasvaja.net/>).

Melanoomi tekkepõhjus ei ole lõplikult teada. Ühe põhjusena on arvestatav UVA ja UVB kiirgus (Ivry, Ogle *et al.* 2006), mis tulene päikesest või solaariumist, tungib pindmisesse nahakihti – epidermisesse – ja kahjustab melanotsüütide DNAd. Kahjustatud rakk on vähi tekke eelduseks (Kobayashi, Nakagawa *et al.* 1998).

Melanoom võib tekkida nii nahal kui ka kõigis teistes kehapiirkondades, kaasaarvatud limaskestade epiteelil ja silma pärissoonkestas e. koroideas, kõikjal kus melanotsüüdid asetsevad. Melanoom võib tekkida olemasolevast neevusest e. sünnimärgist, samuti täiesti uuest kiiresti kasvavast ja muutuvast pigmendilaigust (<http://www.kasvaja.net/>).

See on üks ohtlikumatest inimese pahaloomulistest kasvajatest, mis tihti tekitab peaaegu kõikidesse organitesse retsidiive ja metastaase lümfoogeensel ning hematogeensel teel (<http://www.kasvaja.net/>).

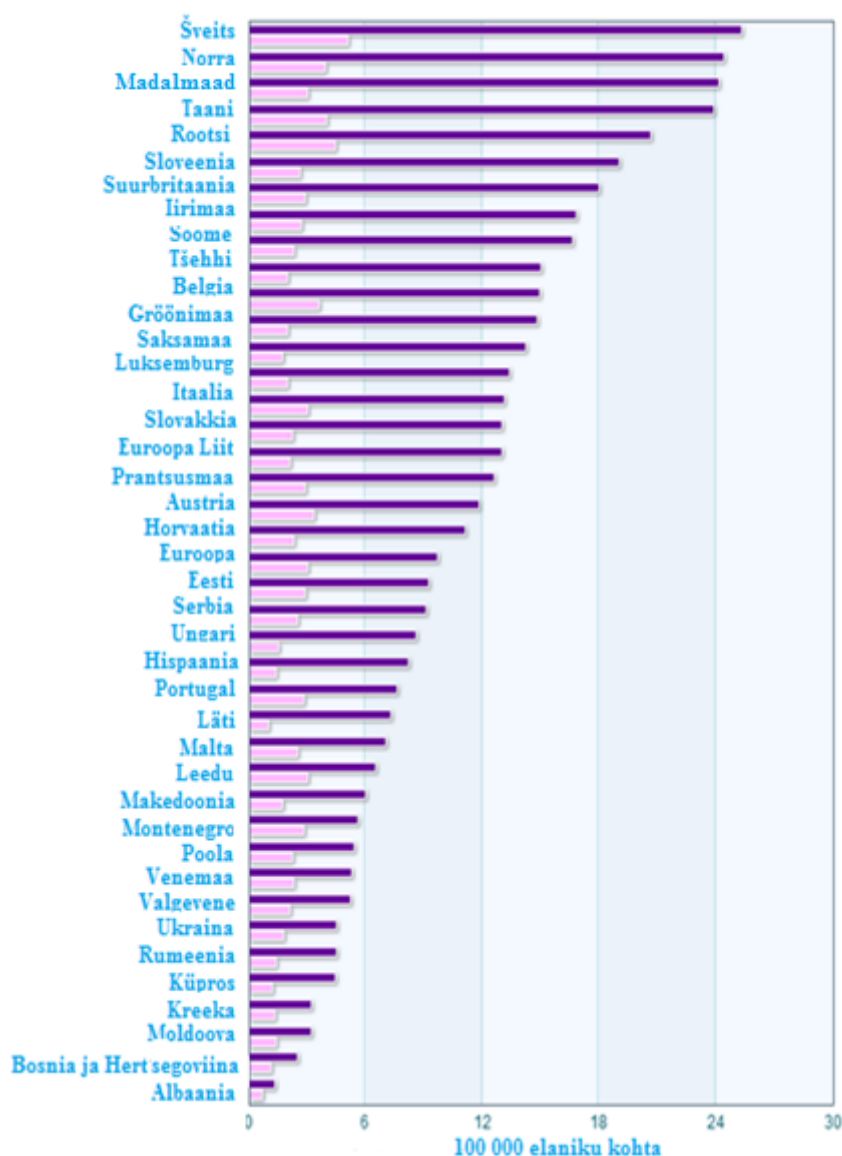


Joonis 1: Melanoomi näide. Kasvaja on asümmeetriliste piirjoontega ja ebaühtlase värvusega (Andmed: <http://findmeacure.com/2009/01/09/melanoma/>).

Melanoomile on iseloomulik kiire haigestumise tõus valge elanikkonna hulgas kogu maailmas (3-7% võrra igal aastal) (Chang, Karnell *et al.* 1998; Lens and Dawes 2004). Viimase 20 aasta jooksul on melanoomi haigusjuhtude arv kahekordistunud (Costin and Hearing 2007). Haigestuda võivad igas vanuses inimesed, kuid vastuvõtlikum on noorem vanusegrupp. Samuti esineb melanoom sagedamini nendel, kes oma töö tõttu palju aega väljas päikese käes peavad viibima. Viimase sajandi jooksul on nahavähist saanud valgete inimeste seas kogu maailmas võimas, kuid vähetuntud epideemia. Melanoom on harvemini esinev võrreldes teiste kasvajatüüpidega. Siiski on see üks ohtlikematest kasvaja vormidest ja põhjustab suurema osa haigestunute surma (75%) (Andmed: www.findmeacure.com/2009/01/09/melanoma/). Vastavalt MTO (Maailma Terviseorganisatsioon) statistikale, sureb maailmas melanoomi 50 tuhat inimest aastas.

Igal aastal diagnoosivad arstid maailmas umbes 200000 uut melanoomi haigusjuhtu. 2012. aastal diagnoositi maailmas 232000 uut melanoomi haigusjuhtu (www.wcrf.org). Kõige rohkem oli neid registreeritud Norras, Sveitsis ja Madalmaades (Joonis 2).

Hinnanguline esinemissagedus ja suurem pahaloomulisest melanoomist maailmas 2012 aastal



Joonis 2: Melanoomijuhtude ja neist põhjustatud surmade statistika, 2012 a. (modifitseeritud) (Andmed: www.cancerresearchuk.org). Kõige rohkem haigusjuhtumeid oli registreeritud Šveitsis, Norras ja Madalmaades, kõige suurem suremus esines Šveitsis, Rootsis ja Taanis.

Lisaks registreeritakse väga palju uusi haigusjuhte USAs, Kanadas, Kuubal, Põhja-Euroopas, Austraalias. Kõige madalamat haigestumist on täheldatud Indias ja Maldiividel (Andmed: www.cancerresearchuk.org). Eestis esineb aastas 800-900 esmast nahavähi juhtu, nendest umbes 130 on melanoomi esmasjuhud. Naised haigestuvad sagedamini, meestel esineb kasvajat poole vähem, kuid mehi sureb poole rohkem, kuna melanoom avastatakse neil tihti liiga hilja. Tavaliselt ilmnevad melanoomi sümptomid meestel seljal ning naistel jalgadel ja

näol (päikesega kõige rohkem mõjutatavad alad) (<http://www.kasvaja.net/>). Suremuse statistika alusel suri mailmas 2012. aastal melanoomi 55,5 tuhat inimest (www.wcrf.org). Pärast melanoomi diagnoosimist jääb Eestis ellu ligi 60% patsientidest, samal ajal kui Šveitsis 87%, Soomes 80% ja Poolas 56% (Andmed: cancer.ee).

Peamiseks ravimeetodiks peetakse ka tänapäeval kasvaja kirurgilist eemaldamist. Seda meetodit kasutatakse tavaliselt melanoomi varasema staadiumi puhul, kui kasvaja on veel õhuke ega ole levinud naaberkudedesse (Andmed: www.kasvaja.ee). Tavaliselt 50% juhtudest on elulemus 5 aasta jooksul 80-100% (Pisani, Bray *et al.* 2002). Kuid kaugemale arenenud haiguse korral on prognoos kehv, kus 5 aasta elulemus on alla 10% (Barth, Wanek *et al.* 1995, Eton, Legha *et al.* 1998) ja keskmine elulemus on 6-8,5 kuud (Crosby, Fish *et al.* 2000).

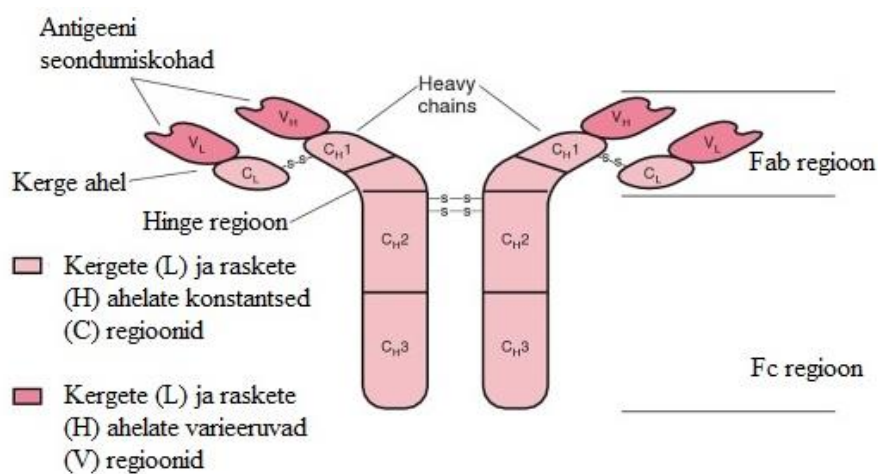
Kemoteraapias on melanoomi puhul kasutusel rida preparaate (näiteks müstofaraan, dakarbasiin) (Crosby, Fish *et al.* 2000). Praeguseks on USA FDA poolt heaks kiidetud ainult dakarbasiin (Crosby, Fish *et al.* 2000; Hillner, Agarwala *et al.* 2000), kuigi raviefekt on madal, ca 6-10 %. Seetõttu leiab kemoteraapia kasutamist vaid üksikjuhtudel ning on kaugemalearenenud melanoomi korral jätkuvalt ebapiisav (Lee, Tomsu *et al.* 2000, Bajetta, Del Vecchio *et al.* 2002). Hiljuti on saavutud positiivseid tulemusi preparaatidega Ipilimumab (monoklonaalne antikeha, mis blokeerib tütotoksilise T-lümfotsüütide antigeeni-4 (*ingl. CTLA-4 – cytotoxic T-Lymphocyte antigen-4*) (Hodi, O'Day *et al.* 2010) ja vemurafenib (BRAF kinaasi inhibiitor) (Flaherty, Puzanov *et al.* 2010). Need on ainukesed nn. „uue põlvkonna“ ravimid, mis erinevad vanadest tsütotoksilistest ainetest (Luke and Schwartz 2013).

Uuema raviviisina on kasutusele võetud immuunoteraapia, mis baseerub printsiibil, et peremehe immuunsüsteem on võimeline genereerima immuunvastust kasvaja antigeenide vastu. Kombinatsiooni keemiaraviga kasutatakse juhul, kui melanoom on kaugmetastaase andnud (Riker, Radfar *et al.* 2007). Praeguseks on FDA poolt kinnitatud metastaatilise melanoomi ravimiks interleukiin-2. Samuti on FDA poolt aktsepteeritud INF- α (interferoon-alfa) kasutamine (Crott 2004), kuid positiivseid tulemusi on märkimisväärselt vähem (Kim, Dessureault *et al.* 2002; Riker, Radfar *et al.* 2007). Tänapäeval püütakse luua ka melanoomivastaseid antikehi, mis oleksid melanoomi-spetsiifilised ja avaldaksid tugevat inhibeerivat toimet melanoomi rakkude proliferatsioonile (Patel *et al.* 2008).

1.3. Antikehad

Antikehad on glükoproteiinid, mis kuuluvad immuunoglobuliinide (*Ig- ingl. Immunoglobulin*) perekonda (Williams and Barclay 1988; Elgert, 1998. Immunoloogia õpik; Harpaz and Chothia 1994). Need on antigeeni siduvad valgud, mis asuvad B-rakkude membraanil või on sekreteeritud plasmarakkude poolt.

Antikehadel on sarnane üldine struktuur - nad koosnevad kergetest (*L – ingl. light*) ja rasketest (*H – ingl. heavy*) peptiidahelatest. Iga ahel koosneb omakorda varieeruvast (*V – ingl. Variable*) ja konstantsest (*C – ingl. Constant*) domäänist (Elgert, 1998. Immunoloogia õpik; Williams and Barclay 1988)(Joonis 3).

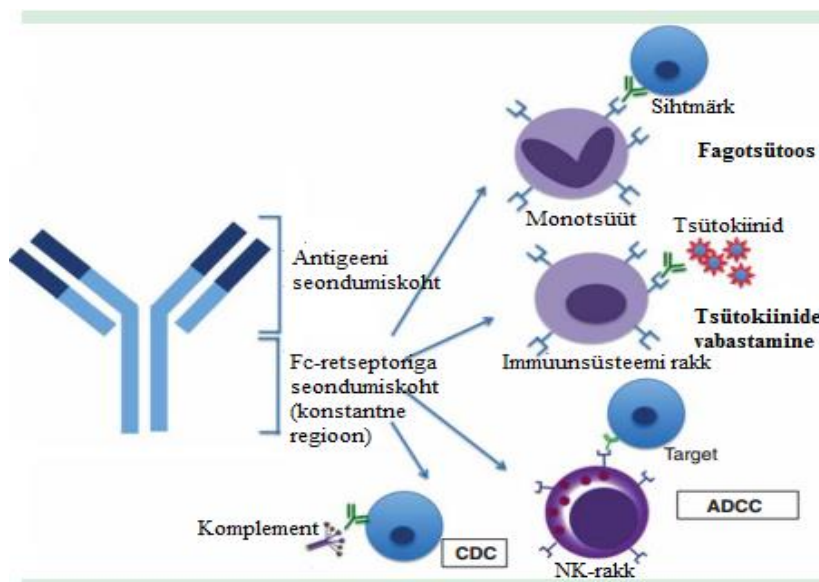


Joonis 3: Antikeha skemaatiline struktuur (Elgert, 1998. Immunoloogia õpik; modifitseeritud). Iga antikeha koosneb kahest funktsionaalsest osast: Fab ja Fc regioonist. Fab tagab antikeha spetsiifilisuse ja Fc vastutab antikeha efektor-funktsioonide esilekutsumise eest. Struktuurselt on igal antikehal rasked ja kerged ahelad, mis omakorda koosnevad konstantsest ja varieeruvast domäänist.

Iga V ja C domään koosneb umbes 100-130 aminohappejäägist, keskmiselt 12000-13000 Da. Kolme C domääniga rasketel ahelatel on tihtipeale speisser-hingeregioon esimese CH1 ja teise CH2 domääni vahel. Tüüpilise kerge ahela molekulmass on 25 kDa, raske ahela oma on aga koos oma kolme C-domääni ja hingeregiooniga suurem – 55 kDa. (Schroeder and Cavacini 2010).

Antikeha Y-kujuline struktuur jaguneb kaheks erinevaks funktsionaalseks osaks: Fab ja Fc regiooniks (Smith, Nelson *et al.* 2004). Raske ahela konstantne domään tagab antikeha

efektoorsed funktsioonid, samal ajal kui paaris olevad kerge ja raske ahela variaabelsed domäänid annavad antikehale tema antigeense spetsiifilisuse (Joonis 4). Fab regioon sisaldab üht tervet kerget ahelat ning variaabelse ja C_{H1} osa raskest ahelast. Fab regiooni eelpool mainitud variabeelne fragment on 100-110 aminohappejäägi pikkune ja selle funktsiooniks on spetsiifiline antigeeniga seondumine (Schroeder and Cavacini 2010). Selle tulemusena on antikehad võimelised põhjustama aglutinatsiooni ja antikeha-antigeeni komplekside välja sadenemist, blokeerima viiruste retseptoreid ja stimuleerima teisi immuunvastuseid (Kapur *et al.*, 2012, Immunoloogia õpik). Antikeha Fc osa koosneb kolmest (IgG, IgA ja IgD) või neljast (IgM) C_H domäänist. Fc regioon seondub Fc γ retseptoreid omavate immuunsüsteemi rakkudega (nagu näiteks monotsüüdid, makrofaagid, dendriitrakud). Samas võib Fc regioon mõjutada ka antikeha antigeeniga seondumise afiinsust või kineetikat (Torres and Casadevall 2008). Fc γ retseptorid mängivad tähtsat rolli terapeutiliste mAb-ide efektiivsuse modelleerimises, kuna nad on osalised Fc γ retseptoritest sõltuvas fagotsütoosis, tsütokiinide produktsioonil, antikeha-sõltuvas rakulises tsütotoksilisuses (ADCC – *ingl. antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) ja komplement-sõltuvas tsütotoksilisuses (CDC - *ingl. complement-dependent cytotoxicity*)(Chan, Ong *et al.* 2015; Kapur *et al.* 2012, Immunoloogia õpik).



Joonis 4: Antikeha struktuur ja selle efektor-funktsioonid, mida aktiveeritakse Fc osa kaudu (Chan, Ong *et al.* 2015; modifitseeritud). Fab regioon vastutab antigeenide spetsiifiliste sidumise eest, samas Fc regioon seondub Fc γ retseptoritega immuunrakkude peal, mis omakorda põhjustab fagotsütoosi, tsütokiinide vabanemist, ADCC või CDC.

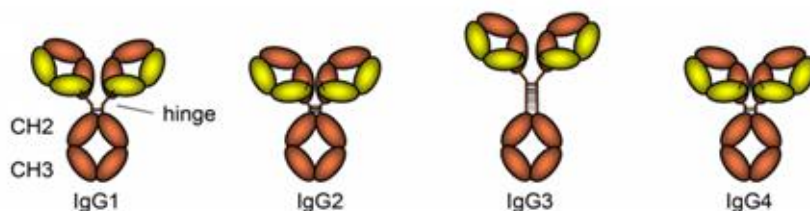
Esineb 5 erinevat antikehade klassi: IgG, IgA, IgE, IgM, IgD (Tabel 1). Iga immuunoglobuliinide klass erineb oma bioloogiliste omaduste poolest ja on suunatud erinevat tüüpi kindlatele antigeenidele (Kapur et al. 2012, Immunoloogia õpik).

Tabel 1: Antikehade tüübid ja nende funktsioonid. On olemas 5 erinevat antikehade tüüpi, millest igal on oma ainulaadne struktuur, tagades sellele tüübile omase spetsiifilise funktsiooni (Kapur et al. 2012, Immunoloogia õpik; modifitseeritud).

Nimetus	Tüüpide arv	Kompleks	Primaarne funktsioon
IgA	2	Dimeer	Takistab patogeene kolonisatsiooni soolestikus ja hingamisteedes
IgD	1	Monomeer	Funktsioneerib antigeeni retseptorina B rakkudel, mis ei ole antigeenile eksponeeritud
IgE	1	Monomeer	Seondub allergeenidega ja põhjustab histamiini vabastamise
IgG	4	Monomeer	Tagab suurema osa antikehadel-põhinevast immuunsusest
IgM	1	Pentameer	Elimineerib patogeene B rakkude poolt esilekutsutud immuunvastuse varases staadiumis

1.3.1. Immunoglobuliin G

Inimesel on eristatavad neli IgG isotüüpi, mis erinevad üksteisest gamma ahela järjestuse poolest. Need on nummerdatud vastavalt kontsentratsiooni vähenemisele vereseerumis: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 (Schur 1988; Elgert, 1998, Immunoloogia õpik). Kõik alamklassid on kõrgelt konserveerunud, erinedes just konstantse piirkonna, täpsemalt hinge-regiooni ja CH2 poolest (Joonis 5). Selle tulemusena on igal subklassil oma efektor-funktsioon. Lisaks on neil ka oma iseärasused immuunkomplekside moodustamisel, komplemendi aktiveerimisel, poolestusajas ja võimes platsentat läbida (Vidarsson, Dekkers *et al.* 2014).



Joonis 5. IgG erinevate alamklasside skemaatiline struktuur: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 (Vidarsson, Dekkers *et al.* 2014; modifitseeritud). Kõik need alamklassid on kõrgelt konserveerunud, erinedes oma konstantse regiooni, konkreetset hinge regiooni ja CH2 regiooni poolest.

1.3.1.1. 5A2 antikeha

5A2 antikeha on meie laboris (Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituut) välja töötatud melanoomispetsiifiline monoklonaalne antikeha. See on IgG1 tüüpi antikeha, mis tunneb ära kindla epitoobi türosinaasi valgus 229-241 aminohapete vahel (Jaanson, Moll *et al.* 2003)

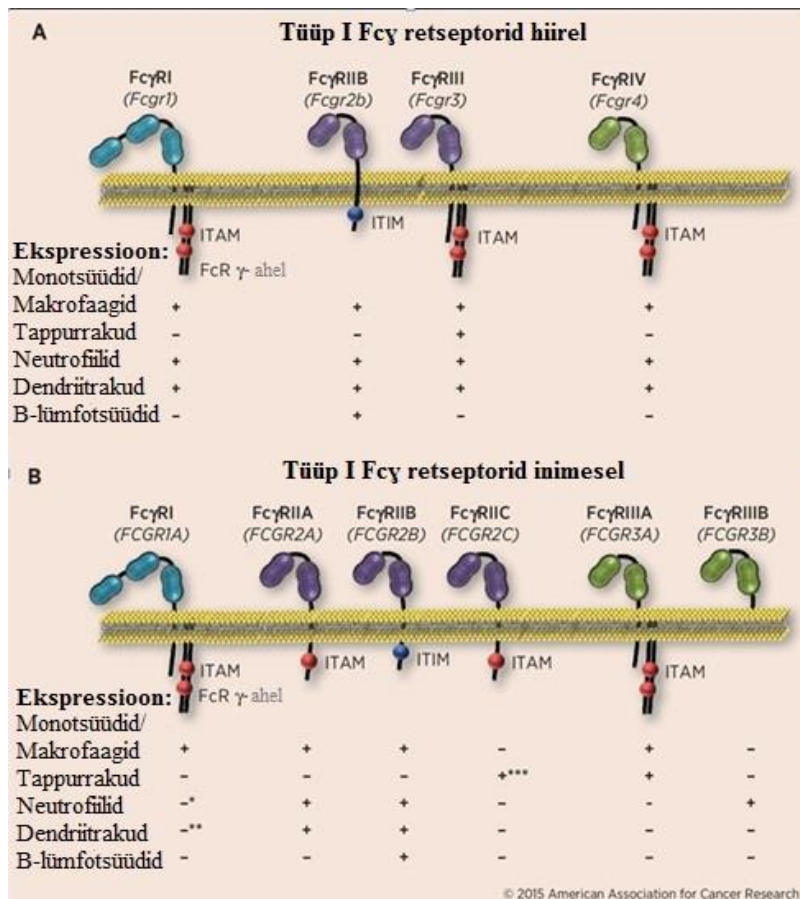
1.4. Fc retseptorid

Fc retseptorid on transmembraansed glükoproteiinid, mis on tähtsad antikehast-sõltuvate immuunvastuste tekkimises (Ravetch and Kinet 1991). On olemas kahte tüüpi Fc retseptoreid, millega antikehad interakteeruvad: tüüp I ja tüüp II. Tüüp I retseptorid kuuluvad Ig superperekonda ja need on kanoonilised IgG jaoks. Tüüp II Fc retseptorid on lektiin C -tüüpi retseptorite perekond. Need vastutavad rakk-rakk adhesioonide eest, patogeenide vastu suunatud immuunvastuste ja apoptoosi eest (Andmed: www.genenames.org). See, millise Fc retseptori tüübiga antikeha seondub, sõltub viimase Fc regiooni konformatsioonist (Ahmed, Giddens *et al.* 2014). Kuna antud uurimistöös on kasutatud esimest tüüpi Fc retseptoreid, siis pole II tüüpi retseptoreid siin käsitletud.

1.4.1. Tüüp I retseptorid

Selle rühma liikmeteks on Fc retseptorid, mis on omakorda jagatud kaheks funktsionaalselt erinevaks subklassiks: aktiveerivad ja inhibeerivad retseptorid (Ravetch and Lanier 2000). Aktiveerivad retseptorid põhjustavad rakkude aktiveerumist, näiteks nende tsütoplasmaatilises osas asuva immuunoretseptor türosiinil põhineva aktiveeritava motiivi (*ing. immunoreceptor tyrosine-based activation motif – ITAM*) kaudu. Nende hulka kuuluvad inimesel: FcγRI/CD64 (FcγRIa, FcγRIb, FcγRIc), FcγRII/CD32 (FcγRIIa, FcγRIIc), FcγRIII/CD16 (FcγRIIIa, FcγRIIIb) ja hiirel: FcγRI, FcγRIII ja FcγRIV. Samal ajal sisaldavad inhibeerivad retseptorid immuunoretseptor türosiinil põhinevat inhibeerivat motiivi (*ing. immunoreceptor tyrosine-based activation motif – ITIM*), tänu millele need retseptorid on suutelised edastama inhibeerivaid signaale (Hulett and Hogarth 1994; Daeron 1997; Gerber and Mosser 2001). Inhibeerivaks retseptoriks nii hiirel kui ka inimesel on FcγRIIB retseptor (Nimmerjahn and Ravetch 2011). Mõlemad, nii aktiveerivad kui ka inhibeerivad retseptorid, on ekspresseeritud immuunsüsteemi rakkude poolt (Miettinen, Rose *et al.* 1989; Amigorena, Bonnerot *et al.* 1992).

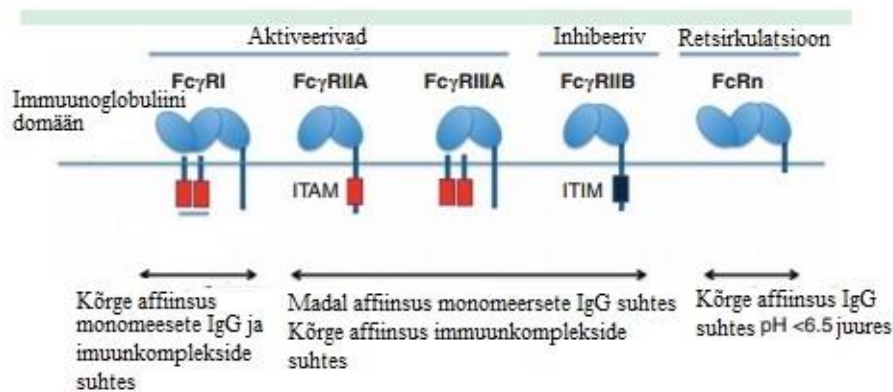
Fc retseptorite ekspressioonimuster erineb veidi hiire ja inimese vahel. Hiire tapurrakud ekspresseerivad eksklusiivselt Fc γ RIII ja inimese omad ekspresseerivad peamiselt Fc γ RIIA. Mõlema organismi B rakud ekspresseerivad Fc γ RIIB. Hiire dendriitrakud ekspresseerivad kõiki Fc retseptoreid, seevastu kui inimese dendriitrakud sünteesivad ainult üht aktiveerivat Fc retseptorit – Fc γ RIIA, ja üht inhiveerivat Fc retseptorit – Fc γ RIIB (Joonis 6) (Nimmerjahn and Ravetch 2008).



Joonis 6: Hiire (A) ja inimese (B) tüüp I Fc retseptorite liikmed ja nende ekspressioonimustrid (Ahmed, Giddens *et al.* 2014; modifitseeritud). Nii hiirel kui ka inimesel on olemas aktiveerivaid ja inhiveerivaid retseptoreid. Hiirel esineb 4 Fc γ retseptorite vormi, seevastu kui inimesel on neid 6. Nende ekspressioonimuster erineb hiire ja inimese vahel. Inhiveerivaks retseptoriks mõlema liigi puhul on Fc γ RIIB retseptor, mille ekspressioonimuster on nii hiire kui ka inimese puhul sama.

Tüüp I Fc retseptorid (erandiks Fc γ RI) on mõõduka või madala afiinsusega ja seepärast ei seo need monomeerseid IgG-sid tavalistes füsioloogilistes tingimustes (Hulett and Hogarth, 1994) (Joonis 7). Need retseptorid on suunatud immuunkomplekside või IgG-dega kaetud

märklaudude sidumiseks, mis viib retseptorite ristsidumisteni ja rakuliste efektor-funktsioonide esilekutsumiseni (Nimmerjahn and Ravetch 2005).



Joonis 7: Fc retseptorite afiinsus monomeersete IgG-de ja immuunkomplekside suhtes (Chan, Ong *et al.* 2015, modifitseeritud). Peaaegu kõik Fcγ retseptorid on madala afiinsusega monomeersete IgG-de suhtes tavalistes füsioloogilistes tingimustes (erandiks FcγRI tüüp ja FcRn tüüp pH<6,5 juures). Samal ajal on neil retseptoritel (v.a FcRn) kõrge afiinsus immuunkomplekside suhtes.

1.4.2. FcγRIIB retseptorid ja kasvaja

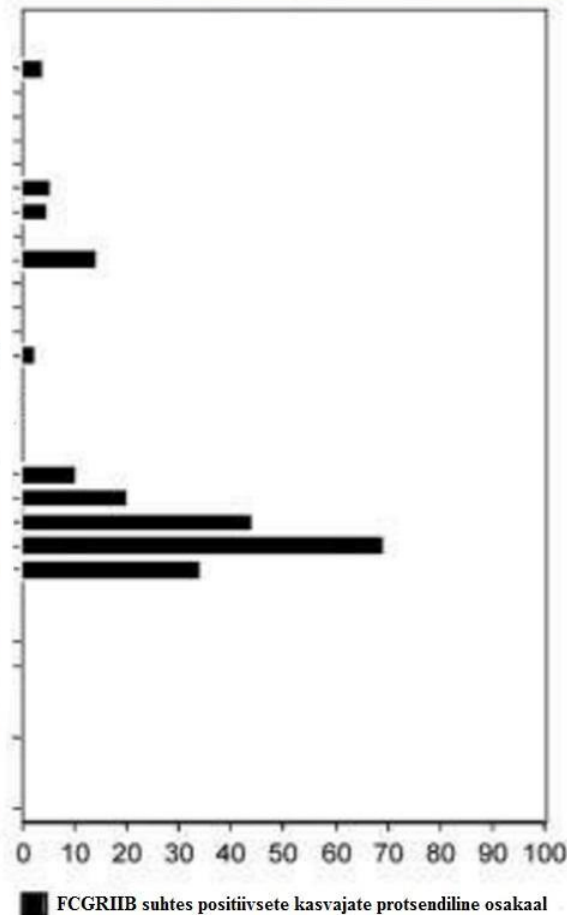
Tavaliselt ekspresseeritakse Fc retseptoreid immuunsüsteemi rakkude poolt, kus sõltuvalt oma liigist (aktiveerivad või inhibeerivad retseptorid) edastavad nad kas aktiveerivaid signaale, põhjustades näiteks B rakkude aktivatsiooni, või inhibeerivaid signaale, inhibeerides rakke, mille peal nad esinevad. Aga on leitud, et ka mittevereloomelise päritoluga rakud suudavad ekspresseerida FcγR retseptoreid (Langerhansi rakud) (Schmitt *et al.* 1990). 1976 aastal pakkusid Barslawsky ja kaastöötajad välja teooria, et mõnede tuumorite rakud ekspresseerivad oma pinnal Fc retseptoreid (Barslawsky *et al.* 1976). 2008 aastal sai see arvamus ka kinnituse Cassard ja kolleegide poolt, kes analüüsisid 259 primaarse ja 187 metastaatilise kasvaja koelõike. Nad jõudsid järelduseni, et mitmed kasvajakud ekspresseerivad oma pinnal Fc retseptoreid, valdavalt FcγRIIB retseptoreid (Cassard, Cohen-Solal *et al.* 2008). Suurem osa primaarse kasvajakute rakkudest olid negatiivsed FcγRIIB retseptori suhtes, kuid mõnedel siiski leiti madal ekspressioon (umbes 2,7%). Metastaatilise melanoomi proovides leiti aga 34% positiivseid FcγRIIB suhtes (Cassard, Cohen-Solal *et al.* 2008) (Joonis 8).

Primaarsed kasvaja

Melanoom	(82)
Kopsud	(51)
Kõri	(10)
Kilpnääre	(6)
Rind	(26)
Aju	(19)
Käärsool	(23)
Pankreas	(14)
Munasari	(7)
Eesnääre	(5)
Kusepõis	(6)
Emakakael	(10)
Kokku	(259)

Metastaatilised kasvaja

Melanoom	
Nahk	(29)
Kopsud	(10)
Lümfisõlmed	(66)
Maks	(16)
Kokku	(121)
Jämesool	
Lümfisõlmed	(18)
Maks	(15)
Kopsud	
Lümfisõlmed	(22)
Rind	
Lümfisõlmed	(11)



Joonis 8: FcγRIIB-positiivsete kasvajate protsentuaalne osakaal (Cassard *et al.* 2006; modifitseeritud). Sulgudes olevad numbrid näitavad analüüsitud proovide arvu, horisontaalsed read näitavad FcγRIIB-positiivsete kasvajate protsentuaalset osakaalu. Suurem osa primaarsete kasvajate rakkudest olid negatiivsed FcγRIIB retseptori suhtes. Kuid mõnedel primaarsetel kasvajatel oli siiski retseptori madal ekspressioon, umbes 2,7%. Võrdluseks, metastaatilisest melanoomist oli 34% positiivsed FcγRIIB suhtes.

FcγR mängivad tähtsat rolli organismi immuunvastuse moodustamises ja kontrollivad IgG antikehade efektorfunktsioone. Paljude kasvajakvormide puhul toodab organism tuumorivastaseid antikehi, et tuvastada kasvajakke, tekitada antigeen-antikeha komplekse ja selle kaudu aktiveerida immuunrakke ning sellega omakorda tekitada tuumorivastast immuunvastust (Cassard, Cohen-Solal *et al.* 2008).

1.4.3. FcγRIIB klassi retseptor hiirel ja inimesel

FcγRIIB on ainuke inhibeeriva funktsiooniga retseptor, mis kuulub üheaahelaliste, IgG antikehade suhtes madala afiinsusega retseptorite hulka. Need retseptorid asetsevad rakumembraani välimises kihis (Latour, Fridman *et al.* 1996).

Nii inimesel kui hiirel sünteesitakse kaks erineva spalaissinguga variant - FcγRIIB1 ja FcγRIIB2. FcγRIIB2 ekspresseerivad monotsüüdid, makrofaagid ja dendriitrakud. FcγRIIB1 leidub tavaliselt B rakkudel ja nuumrakkudel (Miettinen, Rose *et al.* 1989).

Need erinevate spalaissingute tulemusena moodustunud retseptorite vormid on peaaegu identsed, erinedes ainult ühe lisaeksoni poolest FcγRIIB1 retseptoril intratsütoplasmaatilist piirkonda kodeerivas järjestuses. Inimesel on selle eksoni pikkus 19 aminohapet, hiirel aga 47 aminohapet. Oletatavasti tänu selle lõigu olemasolule on FcγRIIB2 retseptor suuteline väga efektiivseks (ca. 95%) FcγRIIB2-Ab komplekside internalisatsiooniks, samas kui FcγRIIB1 isovorm teeb seda väga tagasihoidlikult (Van Den Herik-Oudijk, Westerdal *et al.* 1994; Miettinen, Rose *et al.* 1989; Amigorena, Bonnerot *et al.* 1992).

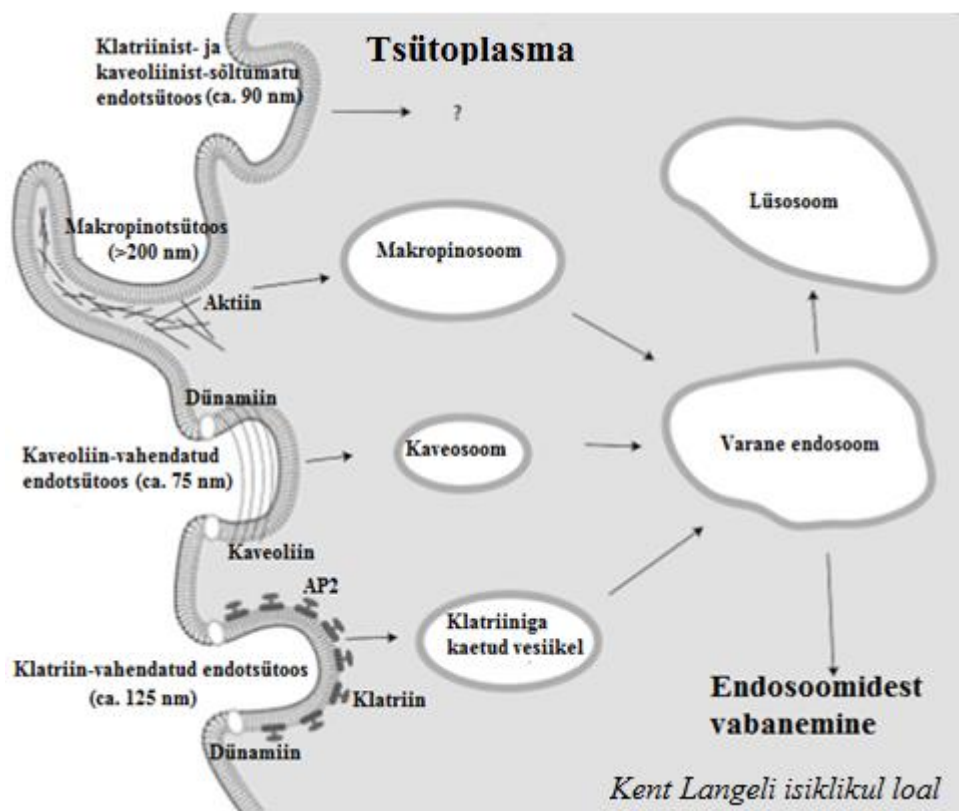
1.5. Endotsütoos

Rakku ümbritsev plasmamembraan on suhtelise läbilaskvusega barjäär raku sise- ja väliskeskkonna vahel. Läbi membraani fosfolipiidse kaksikkihi toimub mõlemasuunaline ainete transport, ehk makromolekulide suunatud liikumine võib toimuda nii ekso- kui ka endotsütootiliselt.

Endotsütoos on aktiivtranspordi mehhanism, mille kaudu toimub raku poolt väliskeskkonnast erinevate komponentide (nt. makromolekulide, tahkete ainete ja erijuhtudel ka teiste rakkude) omastamine. Selle protsessi käigus allaneelatav materjal ümbritsetakse väikse plasmamembraani osaga, mis alguses sopistub sisse ja siis moodustab n. ö. vesiikli. Nende mullide suuruse järgi eristatakse kahte endotsütoosi liiki: fagotsütoos ja pinotsütoos. Fagotsütoosi käigus toimub suurte partiklite sissevõtmine (nt. mikroorganismid ja surnud rakud), tekitades suuri mulle, mida nimetatakse fagosoomideks, tavaliselt >250 nm diameetriga (Alberts *et al.* 2002, Molekulaarbioloogia õpik). See endotsütoosi tüüp on spetsiifilisem ja esineb kindlatel rakutüüpidel, näiteks makrofaagidel, monotsüütidel, neutrofiilidel ja dendriitrakkudel (Aderem and Underhill 1999). Teist liiki endotsütoosi e. pinotsütoosi jaotatakse veel vedela faasi pinotsütoosiks, kus rakku võetakse ekstratsellulaarsed vedelikku ühes seal lahustunud molekulidega ja retseptor-vahendatud pinotsütoosiks, kus makromolekulid kontsentreeruvad rakupinnale ja seonduvad kindlate retseptoritega (Conner

and Schmid 2003). Protsess toimub väikeste mullide e. pinotsütootiliste vesiiklite kaudu, mis on tavaliselt ca. 100 nm diameetriga (Alberts *et al.* 2002, Molekulaarbioloogia õpik).

Morfoloogiliselt jaotatakse endotsütoos omakorda klatriin-vahendatud endotsütoosiks (*CME* - ingl. *clathrin-mediated endocytosis*), kaveoolidest-vahendatud endotsütoosiks (*CvME* - ingl. *caveolae-mediated endocytosis*), makropinotsütoosiks (*MP* - ingl. *macropinocytosis*) ja klatriinist- ja kaveoolidest - sõltumatuks endotsütoosiks (Hillaireau and Couvreur 2009)(Joonis 9).



Joonis 9: Erinevad endotsütoosi rajad (Langel, doktoritöö, 2014; modifitseeritud)

1.5.1. Klatriin - vahendatud endotsütoos

Klatriin-vahendatud endotsütoos on efektiivne ja enim iseloomustatud retseptor-vahendatud endotsütoos (Lamaze and Schmid 1995). Klatriiniga kaetud lohkudesse koonduvad molekulid endotsüteeritakse kiiresti ca. 100-150 nm diameetriga vesiiklite abil (Mukherjee, Ghosh et al. 1997), milles lisaks kolmeharulise struktuuriga klatriinile osalevad mitmed valgulised komponendid, mida nimetatakse adaptorvalkudeks (AP – perekonna valgud). Viimastest on kindlaks tehtud GTPaas dünamiini olulisus, mis seondudes ümber punguva vesiikli kaela

soodustab membraani struktuuri lõhustumist ja sellega vesiiklite eraldumist ning liikumist rakku. Peale klatriin-vahendatud endotsütoosi on düнамиini osalus leitud ka fagotsütoosil, kaveolaarsel endotsütoosil ja osaliselt ka katmata vesiiklite endotsüteerimisel (Hinshaw 2000). Klatriiniga kaetud lohkude eluiga on lühike – umbes üks minut, siis see eraldub plasmamembraanilt ja moodustab klatriiniga kaetud vesiikli. Võtab veel umbes sekund aega, kuni need viskavad oma katte maha ja on võimelised varase endosoomiga ühinema (Cavalli, Corti *et al.* 2001; Alberts *et al.* 2002, Molekulaarbioloogia õpik).

1.5.2. Kaveoolide-vahendatud endotsütoos

Klatriinist sõltumatu vesiikulitega endotsütoosi üks eriliike on endotsütoos kaveoolide kaudu. Kaveoolid on väikesed (diameeter ca. 50-80 nm) ja staatilised plasmamembraani sissesopistumised, mis on olemas enamikes rakkudes, eriti lihasrakkudes, adipotsüütides, endoteeli rakkudes ja fibroblastides (Yamada 1955). Need näevad välja nagu sügavale plasmamembraani invagineerunud „kolvikesed“, mida on võimalik näha elektronmikroskoobiga (Alberts *et al.* 2002, Molekulaarbioloogia õpik). Nende pinda katab granulaarne spiraalitaoline struktuur, mille formeerumiseks on vajalik struktuurse valgu kaveoliini (Rothberg, Heuser *et al.* 1992) ja selle abivalkude olemasolu (van Deurs, Petersen *et al.* 1989). Kaveoolid on membraani mikropiirkondade, mida nim. ka „lipiidseteks parvedeks“ („lipid raft“), spetsiifilise morfoloogiaga vorm. „Lipiidne parv“ on sfingolipiidide ja kolesteroolirikas ala membraanis, kuhu on koondunud märkimisväärne hulk erinevaid membraanseoselisi valke (GPI-ankurdatud valgud) ja sfingomolekule (van Deurs, Petersen *et al.* 1989).

Kaveoolide internaliseerumine toimub aeglaselt (Conner and Schmid 2003) punguva vesiikli „kaelal“ sissesopistust soodustava düнамиini kaasabil (Oh, McIntosh *et al.* 1998).

Kaveoolidest sõltuvat endotsütoosi võivad põhjustada näiteks insuliini retseptorid ja aktiveeritud epidermaalse kasvufaktori retseptorid (Alberts *et al.* 2002, Molekulaarbioloogia õpik).

1.5.3. Makropinotsütoos

Klatriin-sõltumatu endotsütoosi eriliigiks on ainete transport makropinotsütootiliselt. Makropinotsütoos on signaal-vahendatud protsess, mis esineb erinevates rakutüüpides (nt. makrofaagid, vähirakud) (Hillaireau and Couvreur 2009).

Aktiiniga toetatud membraansed väljasopistused tekitavad erineva suurusega (0,5-200 nm) 5-20 minutit eksisteerivaid dünaamilisi struktuure (Lamaze and Schmid 1995), makropinosoome. Makropinosoomide moodustumiseks vajalikke membraanijätkete teke on vahendatud Ras perekonna GTPaaside poolt ja väljasopistuste kokkusulgumine membraaniga toimub fosfatidüülinositol-3-kinaasi (PI3K) ja Ras GTPaaside vahendusel (Sun, Yamamoto *et al.* 2003). Erinevalt teistest pinotsütoosi liikidest on makropinotsütoos sõltuv aktiini polümerisatsioonist ega vaja dünaamiini (Kruth, Jones *et al.* 2005)

1.5.4. Klatriinist- ja kaveoolidest- sõltumatu endotsütoos

See endotsütoosi liik on vähem uuritud, kuna moodustunud vesiiklid ei vaja katet ja on erineva morfoloogiaga (katmata vesiiklid, kerakujulised struktuurid ja tubulaarsed kandjad) (Kirkham, Fujita *et al.* 2005; Romer, Berland *et al.* 2007).

Antud radade efektiivset osalust saab näidata ainult teisi endotsütoosi liike inhibeerivatel tingimustel. Samas on tõestatud, et klatriin-vahendatud internalisatsiooni blokeerimine spetsiifiliste inhibiitoritega ei peata endotsütoosi, vaid suurendab klatriiniga mittekaetud vesiiklite kaudu toimuva endotsütoosi osakaalu (Artalejo, Elhamdani *et al.* 2002; Conner and Schmid 2003).

1.5.5. Inhibiitorid

Klorpromaziin (*Clp- ingl. chlorpromazine*) (Tabel 2, A) on katioonne amfiifiline aine, mis inhibeerib pöörduvalt klatriiniga kaetud vesiiklite moodustumist paigutades klatriini ja tema adaptorvalgud plasmamembraanist intratsellulaarsetesse vesiiklitesse (Ivanov 2008). Seda kasutatakse klatriinist-sõltuva endotsütoosi raja inhibeerimiseks.

Tsütohalasiin D (*CyD- ingl. cytochalasine D*) (Tabel 2, B) ja vortmanniini kasutatakse makropinotsütoosi inhibeerimiseks. Tsütohalasiin D pärsib membraani kurdumist ja kokkuvõtlikult ka endotsütoosi protsessi F-aktiini depolümeriseerimise ja deassambleerimise kaudu (Ivanov 2008). Vortmanniin (Tabel 2, C) inhibeerib PI3K fosfoinosiidi metabolismi,

mis on vajalik tsütoskeleti reorganiseerimiseks. Samal ajal ei ole need kaks inhibiitorit makropinotsütoosi-spetsiifilised, kuna F-aktiini depolümerisatsiooni ja fosfoinositiidi metabolismi inhibeerimine võib samal ajal häirida ka teisi endotsütoosi radasid. Näiteks võib olla tsütohalasiin D samal ajal kasutatud ka kaveool-sõltuva endotsütoosi inhibeerimiseks (Parton, Joggerst *et al.* 1994).

Nüstatiini (*NYS – ingl. nystatin*) (Tabel 2, D) kasutatakse kaveool-sõltuva endotsütoosi inhibeerimiseks. See on seenevastane ravim, mis seondudes kolesterooliga moodustab suuri agregaatide (Ivanov 2008). See asjaolu muudab kaveoolide kuju, inhibeerib seondumist ja edaspidi ka lipiidse kihi ligandi internalisatsiooni. Nüstatiin on üsna kaveool-sõltuva endotsütoosi spetsiifiline, kuna ta ei mõjuta samal ajal teisi endotsütoosi radasid.

Tabel 2: Antud töös kasutatud inhibiitorid ja nende mõju erinevatele endotsütoosi radadele.

CME – klatriin-vahendatud endotsütoos, MP – makropinotsütoos, C/LR – kaveooliin-vahendatud endotsütoos.

Inhibiitor	Toimemehhanism	Mõjutatav rada		
		CME	MP	C/LR
A. Kloorpromaziin	Klatriini ja AP pöörduvad translokatsioonist plasmamembraanist intratsellulaarsetesse vesiklitesse	+++	+	-
B. Tsütohalasiin D	F-aktiini depolümeriseerimine ja deassambleerimine	+	+++	-
C. Vortmanniin	Fosfatidüülinoositol 3-kinaasi inhibeerimine	+	+++	-
D. Nüstatiin	Interakteerub kolesterooliga plasmamembranis	-	-	+++

1.6. *Gaussia* Lutsiferaas

Gaussia Lutsiferaas (GLuc) pärineb bioluminestsest mere aerjalgsest *Gaussia princeps*, keda leidub vetes 350-1000 m sügavusel. Praeguseks on see väikseim bioluminestseeruv valk, mis koosneb 185 aminohappejäägist (molekulmassiga 19,9 kDa). See on sekreteeritav valk ning ta on stabiilne laias pH vahemikus ja temperatuuride skaalas (Wiles *et al.* 2005; Rathnayaka *et al.* 2010).

Gluc-i substraadiks on koelenterasiin, mis reaktsiooni käigus muutub koelenteramiidiks, mis emiteerib valgust 480 nm maksimum intensiivsusel (Rathnayaka *et al.* 2010). Oma aktiivsuseks ei vaja see ATP olemasolu (Kang *et al.* 2008).

Tänu selle tundlikkusele ja signaali kõrgele intensiivsusele kasutatakse seda bioluminestsentsi reporterina DNA hübridisatsioonil, immuunanalüüsidel või imetaja rakkudes katsete puhul, mille korral ei soovita rakke või kudesid signaali mõõtmiseks hävitada (Rathnayaka *et al.* 2010).

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1. Materjalid ja meetodid

2.1.1. Western blot mitte-vereloomelise päritoluga rakuliinidega

Western blot (WB) mitte-vereloomelise päritoluga rakuliinidega FcγRIIB retseptori ja türosinaasi ekspressiooni detekteerimiseks. Nendeks rakuliinideks olid hiire melanoom – B16F0 (ATCC), inimese melanoomi liinid – Bowes (ATCC), MeWo, SK-MEL-5 ja SK-MEL-28 (CLC), inimese emakakaelavähi rakuliin – HeLa, inimese embrüonaalse neeruepiteeli rakuliin – HEK 293 ja Aafrika rohepärdiku neerukoe rakuliin – COS-7 (ATCC).

Valkude ekspressiooni rakkudes analüüsiti 12%-lises SDS polüakrüülamiid geelis, vastavalt Laemmli meetodile. Molekulaarse massi markeriks kasutati Pierce Prestained Protein Molecular Weight Markerit (Thermo Scientific, USA).

Geeliülekanne toimus 15V juures 30 minuti jooksul (Trans-Blot, BioRad) PVDF filtrile (Millipore), mida seejärel inkubeeriti 5%-blokilahuses (5% lõssi, 0,05M Tris, 0,15M NaCl, 0,1% Tween-20) toatemperatuuril 1 tund.

Signaalid detekteeriti inkubeerides filtreid primaarse antikehaga 2%-lõssilahuses (2% lõssi, 0,05M Tris, 0,15M NaCl, 0,1% Tween-20) toatemperatuuril loksutil 1 tund. FcγRIIB retseptori ekspressiooni tuvastamiseks kasutati primaarse antikehana goat anti-CD32B (Santa-Cruz, 1:5000), mis detekteerib nii inimese, kui ka hiire retseptorit. Sekundaarse antikehana – rabbit anti-goat HRP konjugaati (ZyMAX, 1:5000). Türosinaasi ekspressiooni tuvastamiseks kasutati primaarse antikehana türosinaasi vastast 1B8 monokloonset hiire antikeha 5 µg/ml (välja töötatud koos 5A2 antikehaga, kuid on teise epitoobiga). Seejärel pesti filtreid hoolikalt 3 korda 15 minuti jooksul Westerni pesulahusega (0,05M Tris, 0,15M NaCl, 0,1% Tween-20; WWB – ing. Western Wash Buffer) ja inkubeeriti neid sekundaarse antikehaga 2%-lõssilahuses 1 tund loksutil toatemperatuuril: FcγRIIB puhul – rabbit anti-goat HRP, türosinaasi puhul goat anti-mouse HRP konjugaadiga (LabAS, 1:5000).

Filtriribad pesti uuesti 3 korda WWB-ga 15 minuti jooksul. Spetsiifilised signaalid olid eksponeeritud filmile kasutades WB tugevdatud kemoluminestsentsiga detekteerimisreagenti (ECLtm, Amersham Biosciences).

2.1.2 Inimese FCγRIIB ekspresseeriva plasmidi loomine

Inimese FcγRIIB ekspresseeriva plasmidi tegemiseks eraldati totaalne RNA inimese lümfotsüütidest. Seejärel tehti spetsiifilise *reverse* primeriga ja Mulv Revertaasiga esimese ahela DNA, millele järgnes PCR amplifikatsioon spetsiifiliste praimeritega. Edasine katsekäik viidi läbi sarnaselt kirjeldatud bakalaureusetöös (Gerulis, bakalaureusetöö, 2013). PCR produktid kloneeriti pJet vahevektoris ja sekveneeriti. Sekventse võrreldi tarkvara (Bioedit) abil NCBI andmebaasis oleva inimese FcγRIIB järjestusega. Tulemustest selgus, et meil on olemas kaks inimese retseptori vormi FcγRIIB1 ja FcγRIIB2. FcγRIIB2 retseptor on tugevalt endotsütootiline, samal ajal kui FcγRIIB1 retseptoril on see väga tagasihoidlik (Van Den Herik-Oudijk, Westerdaal *et al.* 1994). Edasi kloneeriti mõlemad retseptori järjestused ümber eukariootsesse ekspressioonivektoris pQMc_TagAc (Icosagen AS, Eesti). Konstrukti kloneerimiseks ja paljundamiseks kasutati kompetentseid *E.coli* rakke XL-10 (valmistatud Inoue meetodi järgi, (Inoue *et al.* 1990; Gene 1996). Saadud konstruktid nimetati pQMc_hFGCRIIB1, pQMc_hFCGRIIB2.

2.1.3. Western blot elektroporeeritud COS-7 rakkudega

COS-7 rakud elektroporeeriti järgmiste konstruktidega: pQMc_mTYR, pQMc_hTYR (konstruktid saadud Nele Jaanson käest), pQMc_mFCGRIIB2 (Gerulis, bakalaureusetöö, 2013), pQMc_hFGCRIIB1, pQMc_hFCGRIIB2. Rakud külvati 24 kannuga plaatidele ja inkubeeriti 37 °C juures 48 tundi. Pärast eelmainitud aega koguti rakud tassidelt, pesti PBS'iga ja lüüsi 5×Laemmli puhvris (2% SDS, 50 mM TrisHCl pH 6,8, 0,1% broomfenool sinine, 2% beetamerkaptoetanool, 20% glütserool). Proove inkubeeriti 10 min 100 kraadi juures. Analüüs viidi läbi samamoodi, nagu ülalpool mainitud.

2.1.4. Antikehad

2.4.1. 5A2 antikeha paljundamine ja puhastamine

5A2 antikeha paljundamiseks kasutati vastavaid antikehi tootvaid hübridoomi rakke. Need kasvatati RPMI söötmes (Gibco, Suurbritannia), kuhu oli lisatud 10% veise loote seerumit (*FCS – ing. Fetal calf serum*) (Sebak, Germany), penitsilliini ja streptomütsiini 1 U/ml, 37 °C juures 5%-lises CO₂ atmosfääris.

Kultuuri supernatant koguti iga kolme päeva tagant. Supernatandile lisati aeglaselt 1,2 mahtu 4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (lõppkonts. 2,1 M) ja inkubeeriti 2 h magnetsegajal. Sadenenud valk tsentrifuugiti põhja 30 min $15300\times g$ ning suspendeeriti 1/8 supernatandi algmahust puhvris C (20 mM Na-fosfaat pH 7,0; 3 M NaCl), segati 10 min End-Over-End segajal. Mittelahustunud osa tsentrifuugiti põhja 10 min $10000\times g$. Valku sisaldav lahus filtreeriti läbi 0,22 μm filtri (Millipore). Antikeha puhastati, kasutades ÄKTApurifier'it (GE Healthcare, UK). Antikeha seoti HiTrap Protein G HP 5 ml (GE Healthcare) kolonnile voolukiirusel 2,5 ml/min. Esimene pesu toimus puhvriga C (3 kolonni mahtu, CV). Siis pesti puhvriga A 3 CV (20 mM Na-fosfaat pH 7,0). Eluatsioon toimus puhvriga B (0,1 M glütsiin-HCl pH 2,7) 5 ml/min. Eluaat koguti topsidesse, kuhu oli eelnevalt lisatud 1/10 eluaadi mahust 1 M Tris*HCl, pH 9,0.

Antikeha kontsentratsioon määrati kasutades NanoDrop'i (ThermoFisher Scientific, USA) valguga kontsentratsiooni antikeha programliga. Osa puhastatud antikehast märgistati Dylight Antibody Labelling kitiga vastavalt tootja juhendile (ThermoFisher Scientific).

2.1.4.2. 5A2-GLuc antikeha

5A2-GLuc antikeha oli toodetud Icosagen AS poolt. Selle valmistamiseks konstrueeriti pQMCF vektor, mis ekspresseeris 5A2 κ (*kappa*) ahelat ja rasket ahelat IgG2a konstantse domääniga. Lisaks oli raske ahela konstantse domääni cDNA-le liidetud GLuc kodeeriv järjestus. See vektor transfekteeeriti CHO85EBNALT (Icosagen) rakkudesse, koguti supernatant ning puhastati antikeha raske ahela C-terminusse jääva His-tag kaudu.

2.1.5. Rakkude kasvatamine

COS-7 rakke kasvatati IMDM söötmes (Gibco, Suurbritannia). B16F0 rakke, mis natiivselt ekspresseerivad nii Fc γ RIIb retseptorit kui ka türosinaasi, kasvatati RPMI söötmes (Gibco). Kõigi rakkude söötmesse lisati 10% veise loote seerumit (Sebak, Saksamaa), penitsilliini ja streptomütsiini 1 U/ml, ning inkubeeriti 37 °C juures 5%-lises CO₂ atmosfääris.

Antud töös on kasutatud hiire melanoomi rakuliini B16F0, mis pärineb C57BL6 hiirtest ning on aastaid tuntud melanoomi mudelites kasutatav rakuliin (Fidler, 1975).

2.1.6. Elektroporatsioon

Katseks kasutati Neon transfektsiooni süsteemi (ThermoFisher Scientific). COS-7 rakud

elektroporeeriti 1030 V juures, 2 pulsiga, kestvusega 20 ms. Igaks elektroporatsiooniks kasutati 2 µg DNA'd. Proovideks võeti konstruktid pQMc_mTYR, pQMc_hTYR, pQMc_mFCGRIIB2, pQMc_hFCGRIIB1, pQMc_hFCGRIIB2, elektroporatsiooni efektiivsuse kontrolliks kasutati p4_egfp konstrukti ja negatiivse kontrollina kasutati tühja vektorit pQMc_TagAc.

Elektroporeeritud rakud külvati söötmega täidetud tassidele, kuhu oli eelnevalt paigutatud klaasid. Rakud jäeti termostaati kasvama 37°C juures 48 tunniks.

2.1.7. Internalisatsiooni katse immuonofluorestsents-märgisega antikehadega

COS-7 rakkudesse viidi elektroporatsiooni teel pQMc_mFCGRIIB2, pQMc_mTYR, pQMc_hFCGRIIB2, pQMc_hFCGRIIB1 ja pQMc_hTYR konstruktid. Negatiivseks kontrolliks võeti pQMc_TagAc tühja vektoriga elektroporeeritud rakud ja elektroporatsiooni efektiivsuse määramiseks kasutati p4_dlegfp konstruktiga elektroporeeritud rakke. 48 tundi peale elektroporatsiooni inkubeeriti rakud 5A2 ja 5E11 DL488 märgistatud antikehaga 1 tund 37 °C juures. Siis pesti rakud 3 korda PBS-iga. Seejärel fikseeriti 4% paraformaldehüüdi (PFA)/PBS lahuses 15 minuti jooksul toatemperatuuril, siis loputati 1xPBS lahusega.

Rakutuumade visualiseerimiseks lisati rakkudele 10 µg/ml DAPI 1xPBS lahuses. Rakud inkubeeriti lahuses 30 minuti jooksul pimedas. Siis loputati PBS-iga. Seejärel kanti klaasid rakkudega alusklaasidele. Rakkude kuivamise ja signaali hääbumise takistamiseks kasutati Mowiol slow-fade lahust. Signaal visualiseeriti konfokaalmikroskoobiga Zeiss LSM 710. Kõigile ülesvõtetele kasutati samu laserite tingimusi.

2.1.8. Internalisatsiooni katse 5A2-GLuc antikehaga

2.8.1.1. Internalisatsiooni katse COS-7 rakkudega 37 °C juures

Analüüsiks kasutati eelnimetatud konstruktidega elektroporeeritud COS-7 rakke. Rakud külvati 24 kannuga tassidele 37 °C juurde 48 tunniks. Siis lisati söötmesse 5A2-Gluc antikeha (20 µg/ml), millega inkubeeriti 37 °C juures 1 tund. Seejärel pesti rakke 3 korda 1xPBS lahusega ja lüüsi 100 µl (1xRenilla Luciferase Assay Lysis Buffer (Promega Corporation, USA). Lüsaatidega tassid asetati läbikülmumiseks 10 minutiks -80 °C juurde, siis sulatati. Lüsaadid korjati epsidesse ja fuugiti 5 min täispööretel (11000×g) juures. Valmistati substraadi lahus: 1 osa Renilla Luciferase Assay reagenti ja 200 osa Renilla Luciferase Assay

puhvrit. Iga proovi luminesentsi mõõtmiseks võeti 4 µl rakulüsaati ja 20 µl substraadi lahust. Tulemused mõõdeti luminomeetriga GloMax SIS (Promega).

2.1.8.2. Internalisatsiooni katse COS-7 rakkudega 4 °C juures

Selleks, et teha kindlaks, kas 5A2 antikeha kasutab endotsütootilist protsessi rakku sisenemiseks, korraldati eelnevat katset, inkubeerides eelnevalt elektroporeeritud rakke antikehaga 4 °C juures. Tassid rakkudega asetati 10 minutiks jää peale, siis lisati söötmesse 5A2 antikeha (20 µg/ml). Tassid jäeti jää peale 1 tunniks. Siis tassid pesti 3 korda külma PBS lahusega. Seejärel tõsteti tassid ümber 37 °C juurde ja inkubeeriti seal 1 tund. Edaspidine katse viidi läbi samuti, nagu internalisatsiooni katse 37 °C juures.

2.1.8.3. Internalisatsiooni katse B16F0 rakkudega 37 °C juures

B16F0 rakud külvati 24 kannuga tassile (ca 80000 rakku ühe kannu kohta) ja jäeti 37 °C kasvama. Järgmisel päeval lisati söötmesse 5A2 antikeha (20 µg/ml) ja inkubeeriti 37 °C juures 1 tund. Pärast eelmainitud aega rakke pesti 3 korda PBS lahusega. Edaspidi viidi katse läbi samamoodi, nagu ka internalisatsiooni katse COS-7 rakkudega 37 °C juures.

2.1.8.4. Internalisatsiooni katse B16F0 rakkudega 4 °C juures

B16F0 rakud külvati 24 kannuga tassile (ca 80000 rakku ühe kannu kohta) ja jäeti kasvama 37 °C üle öö. Järgmisel päeval asetati tassid jääle 10 minutiks, seejärel lisati söötmesse 5A2 antikeha (20 µg/ml) ja inkubeeriti 4 °C juures 1 tund. Pärast eelmainitud aega pesti rakke 3 korda jääkülma PBS lahusega, lisati uus sööde ja asetati 1 tunniks 37 °C koekultuuri kappi. Pärast seda pesti tasse 3 korda PBS lahusega, lüüsi ja mõõdeti tulemused, nagu ka internalisatsiooni katses COS-7 rakkudega.

2.1.8.5. Internalisatsiooni katse COS-7 rakkudega 4 °C juures kasutades inhibiitoreid

COS-7 rakke elektroporeeriti uuesti eelmainitud konstruktidega ja külvati 24-kannuga tassidele 37 °C juures 48 tunniks. Pärast eelmainitud aega lisati söötmesse inhibiitoreid:

nüstatiini (50 μ M), kloorpromaziini (10 μ M), tsütohalasiini D (4 μ M) ja vortmanniini (1 μ M). Tassid inkubeeriti 37 °C juures 30 minutit. Seejärel asetati tassid 10 minutiks jää peale. Edasi lisati olemasolevasse söötmesse 5A2-Gluc antikeha (20 μ g/ml). Tassid jäeti jää peale 1 tunniks. Kui mainitud aeg sai läbi, pesti tassid 3 korda PBS lahusega ja viidi katse lõpuni nii, nagu oli eelnevalt kirjeldatud.

2.1.8.6. Internalisatsiooni katse B16F0 rakkudega 4 °C juures kasutades inhibiitoreid.

Esiteks, B16F0 külvati 24-kannuga tassidele (ca 80000 rakke ühe kannu kohta). Järgmisel päeval lisati söötmesse inhibiitoreid, nagu tehti ka COS-7 rakkude puhul. Edaspidine katse viidi läbi sama moodi, nagu COS-7 rakkude puhul.

2.1.9. Statistiline analüüs

Internalisatsiooni katse tulemusi töödeldi ja analüüsiti kasutades GraphPad Prism 7 programmi. Analüüsimiseks kasutati One-way ANOVA meetodit. Tulemused, mille *p*-väärtus oli väiksem kui 0,05 loeti statistiliselt olulisteks.

2.1.10. *In vivo* internalisatsiooni katse fluorestsents-märgistatud antikehaga

48 tundi enne katse algust elektroporeeriti COS-7 rakud inimese ja hiire FcγRIIb2 retseptori ja türosinaasi konstruktidena ning külvati *Nunc™ Lab-Tek™ Chambered Coverglass* 8 kannuga plaadile (Thermo Scientific). Negatiivseks kontrolliks kasutati pQMc_TagAc konstruktiga elektroporeeritud COS-7 rakke. Pärast eelmainitud aega lisati söötmesse 5A2-DL488 antikeha (20 μ g/ml) ja inkubeeriti 37 °C juures. Üks osa proovidest pesti värske söötmega 4 tunni pärast, teine osa proovidest pesti 18 tunni pärast. Seejärel lisati LysoTracker 1 nM. Tuumade visualiseerimiseks lisati Hoechst 33342 lahust (5 μ g/ml) (Thermo Fisher Scientific) ning inkubeeriti veel 15 min 37 °C juures. Enne mikroskoopiat vahetati sööde. Internaliseerunud mAb signaal visualiseeriti konfokaalmikroskoobiga LSM 710 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Saksamaa).

2.2. Töö eesmärgid

- Kontrollida FcγRIIB retseptorite ja türosinaasi ekspressiooni melanoomi rakkuliinides.
- Konstrueerida eukariootsesse ekspressioonivektorisse inimese Fc retseptorit kodeerivad järjestused ja kontrollida nende ning varem olemasolevate türosinaasi ja hiire FcγRIIB konstruktide ekspressiooni.
- Uurida 5A2 antikeha võimet siseneda rakkudesse, selle sõltuvust hiire ja inimese Fc retseptorite ja türosinaasi olemasolust.
- Selgitada välja, millise mehhanismi kaudu 5A2 antikeha siseneb rakkudesse.
- Vaadelda, kas ja kui kiiresti 5A2 antikeha suunatakse lüsoosoomidesse.

2.3. Tulemused

2.3.1. Melanoomi rakuliinid ekspresseerivad FcγRIIB retseptorit ja türosinaasi

Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis kasutatakse nii loomkatseteks kui ka koekultuuri katseteks erinevaid melanoomi rakuliine. Selleks, et teha kindlaks, kas 5A2 antikeha internaliseerumine sõltub FcγRIIB retseptoritest, oli vaja eelnevalt välja selgitada, millised rakuliinid antud retseptorit ekspresseerivad.

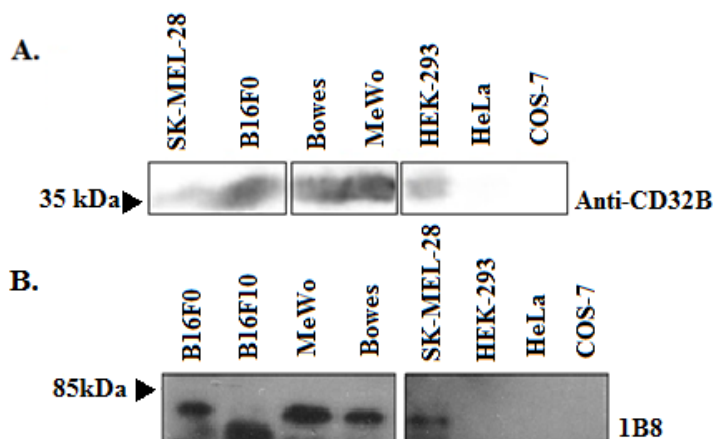
Kuna 5A2 on türosinaasi-vastane antikeha, osutus vajalikuks testida rakuliine türosinaasi ekspressiooni suhtes.

WB viidi läbi melanoomi rakuliinide lüsaatidega: SK-MEL-28, Bowes, MeWo, B16F0. Positiivse kontrollina kasutati HEK-293 rakuliini, mis loomulikult ekspresseerib FcγRIIB retseptorit. Kõik melanoomi liinid ja samuti HEK-293 annavad selge ca 37 kDa kõrgusel oleva signaali, samal ajal negatiivseks kontrolliks kasutatud rakuliinid HeLa ja COS-7 on signaalita (Joonis 10, A).

Türosinaasi olemasolu detekteeriti 1B8 antikehaga, mis tunneb ära nii hiire kui ka inimese türosinaasi. Nagu näha (Joonis 10, B), on kõigis melanoomi rakuliini lüsaatides türosinaas detekteeritav. Samal ajal on see negatiivne HeLa, COS-7 ja HEK293 rakuliinides, mis on mitte-melanoomi liinid.

Seega, kõik meie poolt kontrollitud melanoomi rakuliinid ekspresseerivad FcγRIIB retseptorit ja türosinaasi (Joonis 10). Nagu ka eeldati, HEK-293 rakud olid positiivsed FcγRIIB suhtes,

Samal ajal kui HeLa ja COS-7 rakuliinid olid negatiivsed nii FcγRIIB kui ka türosinaasi ekspressiooni suhtes.

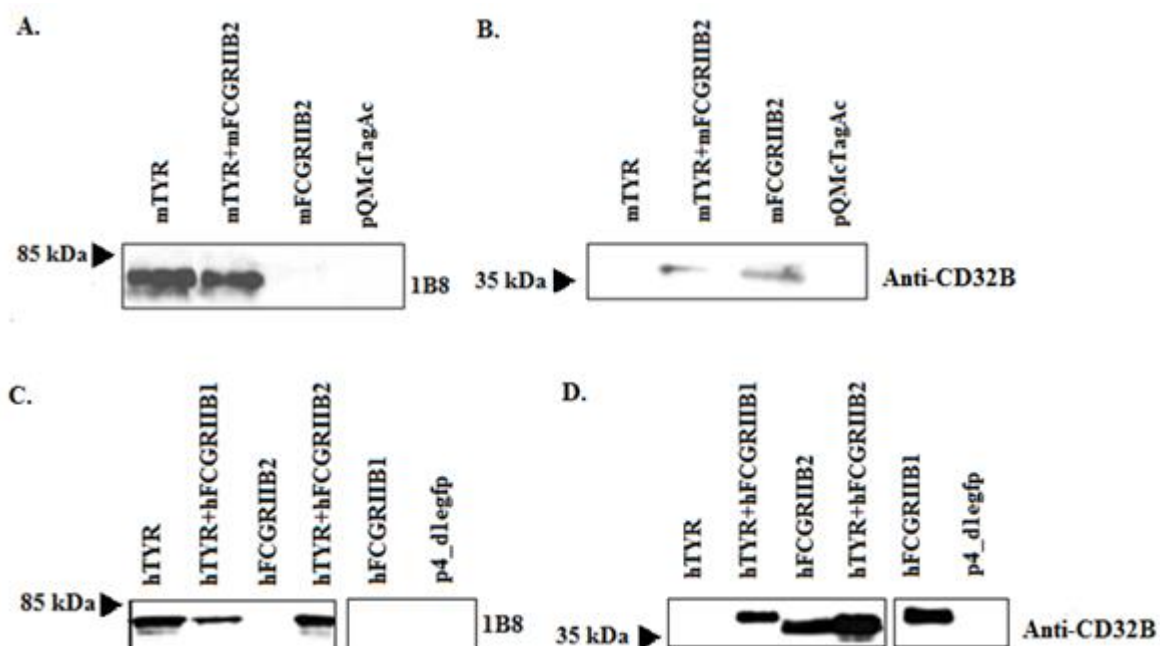


Joonis 10: WB melanoomi rakuliinide lüsaatidega. A) Melanoomi rakuliinid analüüsiti FcγRIIB retseptori ekspressiooni suhtes, kus kõik melanoomi liinid ekspresseerivad seda retseptorit (ca. 37 kDa). Positiivseks kontrolliks kasutati HEK-293 rakuliini ja negatiivseks kontrolliks – HeLa ja COS-7 rakuliine. B) Melanoomi rakuliinid analüüsiti ka türosinaasi ekspressiooni suhtes. Kõik meie poolt välja valitud rakuliinid ekspresseerivad türosinaasi (ca. 75 kDa). Negatiivse kontrollina kasutati HEK-293, HeLa ja COS-7 rakuliine.

2.3.2. Ekspressioonikonstruktide kontroll COS-7 rakkudes

Selleks, et uurida, kas türosinaasi-vastane antikeha on võimeline sisenema rakkudesse ja kas see sõltub FcγRIIB olemasolust, oli vaja esiteks kontrollida CD32 ja türosinaasi kodeerivate plasmiidide ekspressiooni. Selleks valiti COS-7 rakud, kuna eelnevalt oli WB abil kindlaks tehtud, et see rakuliin ei ekspresseeri ei FcγRIIB2 retseptorit ega ka türosinaasi.

Tehtud ekspressioonikonstruktid pQMc_mFCGRIIB2, pQMc_hFCGRIIB2, pQMc_hFcγRIIB1 pQMc_mTYR, ja pQMc_hTYR elektroporeeriti COS-7 rakkudesse ja 48 tunni järel vaadeldi retseptorite ekspressioonitaset WB abil. Negatiivse kontrollina kasutati p4_d1egfp konstrukti, mis oli ka elektroporatsiooni efektiivsuse kontrolliks. Selle tulemusena ekspresseerusid COS-7 rakkudes nii hiire (Joonis 11, B.), kui ka inimese türosinaas (ca. 75 kDa) (Joonis 11, C). Samuti ka hiire FcγRIIB2 retseptor (Joonis 11, A) ning inimese FcγRIIB retseptori mõlemad vormid (Joonis 11, D) (ca. 37 kDa).



Joonis 11: WB FcγRIIB2 retseptori ja türosinaasi konstruktidega elektroporeeritud COS-7 rakkudega. A) COS-7 rakud ekspresseerivad FcγRIIB2 retseptorit. Negatiivseks kontrolliks oli pQMc_TagAc vektoriga elektroporeeritud rakud. B) Türosinaasi konstruktide kontroll: rakud ekspresseerivad hiire türosinaasi. Negatiivseks kontrolliks olid pQMc_TagAc vektoriga elektroporeeritud rakud. C) Inimese türosinaasi ekspressiooni kontroll. D) Samuti ekspresseeritakse inimese FcγRIIB1 ja FcγRIIB2 retseptorit. FcγRIIB1 konstrukti on pikem, kuna omab oma järjestuses lisaeksonit intratsellulaarse osa kodeerivas alas. Negatiivse kontrollina kasutati p4_dlegfp konstrukti.

2.3.3. 5A2 antikeha on võimeline rakkudesse sisenema

WB tulemustest selgus, et COS-7 rakud, kuhu oli eelnevalt elektroporeeritud FcγRIIB2, FcγRIIB1 ja türosinaasi konstruktid, ekspresseerivad FcγRIIB retseptorit ja türosinaasi. Töö järgmiseks etapiks oli välja selgitada, kuidas mõjutab nende ekspressioon rakkudes 5A2 antikeha sisenemist ja kas see on ühesugune inimese ja hiire retseptorite ja türosinaasi puhul.

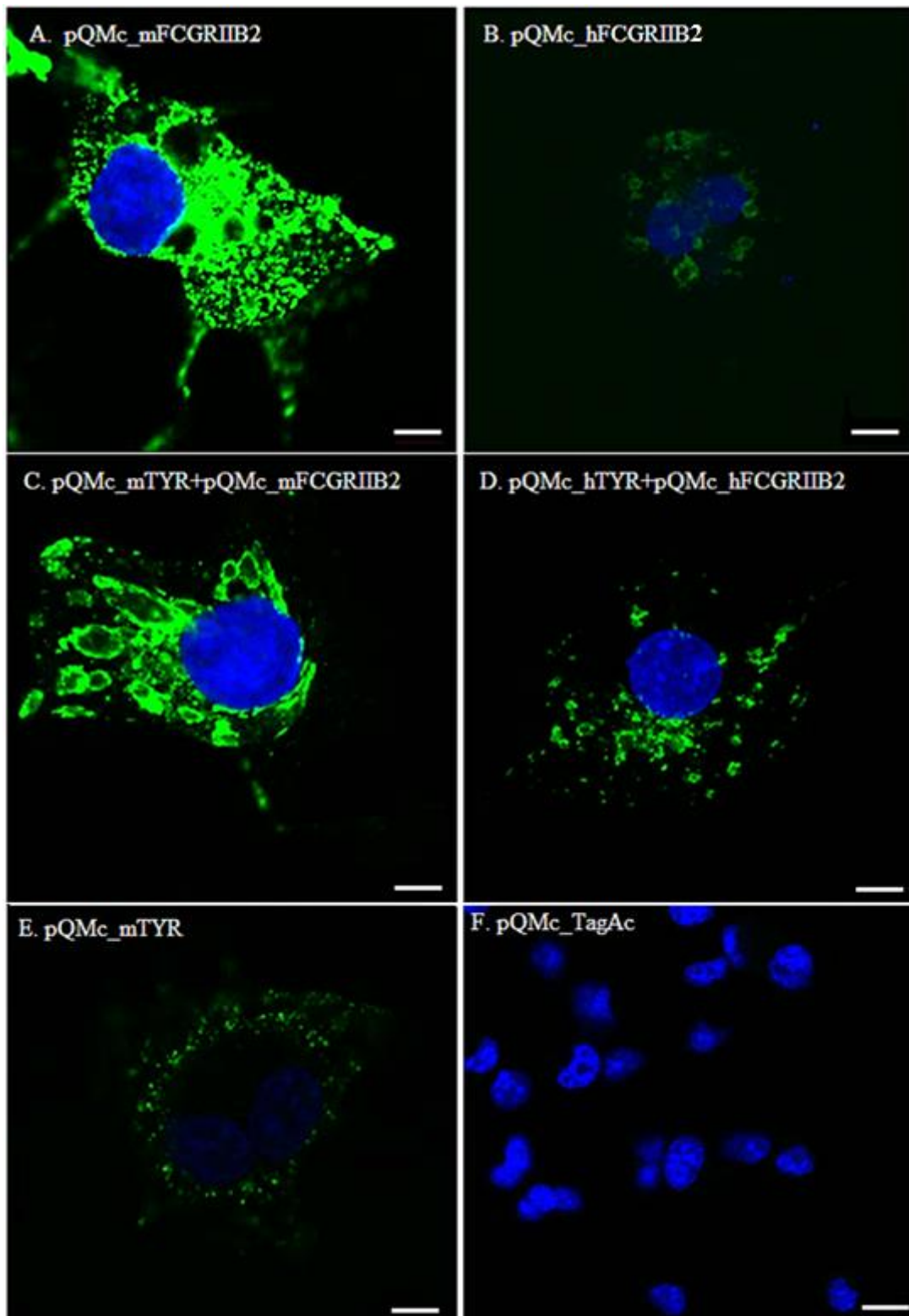
Rakkudes, mis olid elektroporeeritud pQMc_mFCGRIIB2 konstruktiga, oli antikeha roheline signaal näha nii raku pinnal, kui ka sees vesiiklitena (Joonis 12, A, Lisa 1, A). Viimased olid väga mitmesuguse suurusega alates väikestest kuni küllalt suurte ca 5-10 µm diameetrini (Lisa 1, B). Inimese pQMc_hFCGRIIB2 konstrukti puhul oli signaali esinemise muster sama, aga selle tugevus oli kordades nõrgem (Joonis 12, B).

Rakkudel, mis olid elektroporeeritud inimese ja hiire türosinaasiga, oli antikeha signaali näha ainult rakkude pinnal või vahetult selle all (Joonis 12, E). pQMc_Tag konstruktiga

elektroporeeritud rakkudel ei olnud signaali üldse (Joomis 12, F), mis on ka negatiivsele kontrollile oodatav tulemus.

Türosinaasi ja FcγRIIB2 retseptori koossekspressioonil peaks 5A2 sisenemine rakkudesse olema efektiivsem, kui ainult FcγRIIB2 olemasolul, kuna on teada, et see retseptor omab suuremat afiinsust immuunokomplekside (antigeeniga seotud antikehad) suhtes (Hulett and Hogarth, 1994). Aga tulemused olid oodatust erinevad.

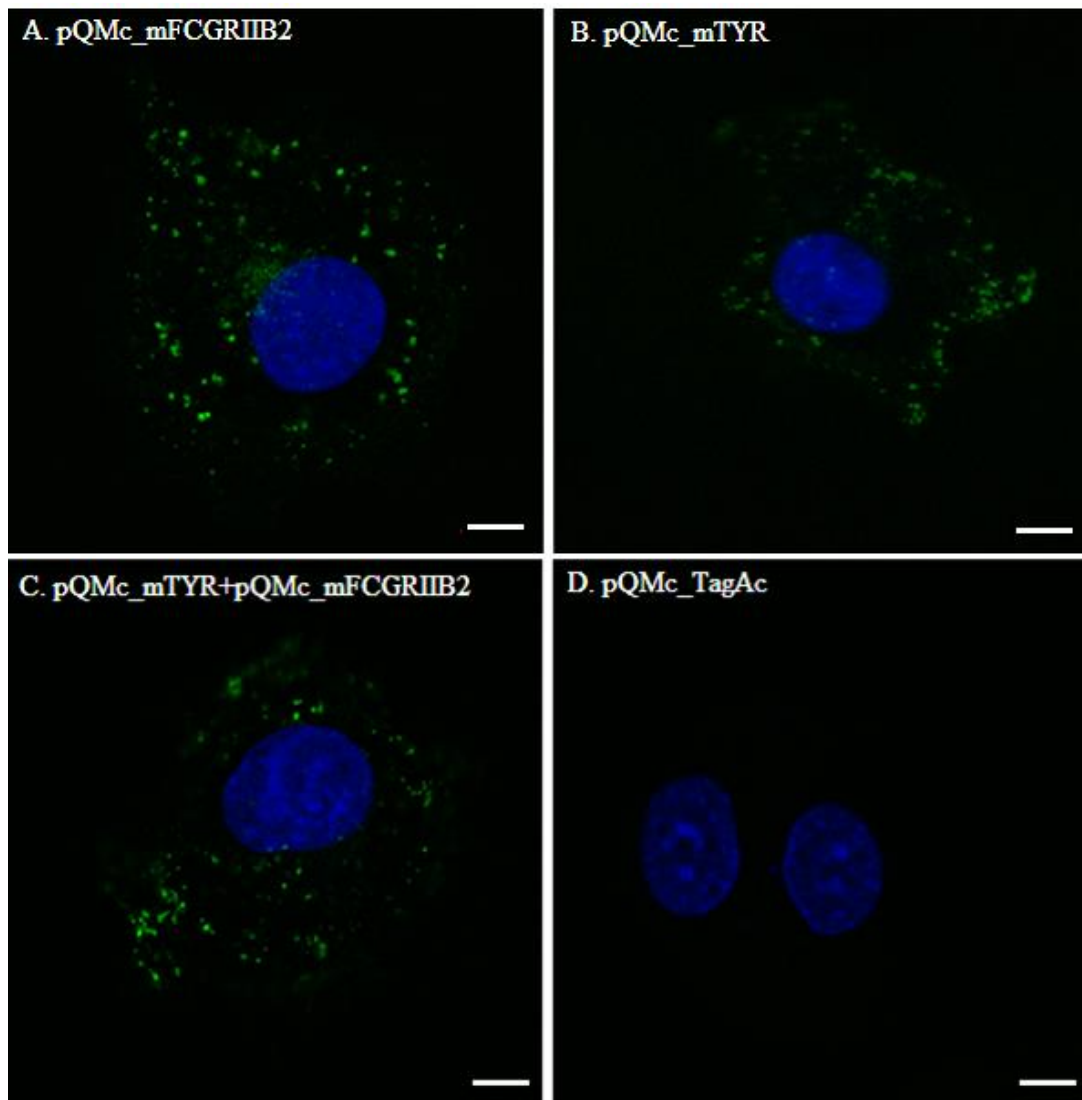
Hiire türosinaasi ja retseptori koossekspressioonil oli antikeha üldiselt vähem, kuid internaliseerumine tekitas rohkelt suuri vesiikleid. Vastupidiselt, inimese pQMc_FCGRIIB2 konstruktiga elektroporeeritud rakkude puhul oli signaal tunduvalt nõrgem (Joonis 12, D), kui inimese retseptorit ja türosinaasi ekspresseerivate rakkude puhul (Joonis 12, C). See tulemus võib olla tingitud hiire IgG1 antikeha madalamast afiinsusest inimese FcγRIIB2 retseptori suhtes.



Joonis 12: 5A2 antikeha asukoha detekteerimine elektroporeeritud COS-7 rakkudes. A) Hiire FcγRIIB2 retseptori olemasolul oli antikeha roheline signaal näha nii raku sees kui ka raku pinnal. B) Inimese FcγRIIB2 retseptori ekspressioonil oli antikeha signaal mustri poolest sama, aga oluliselt nõrgem. C) Hiire türosinaasi ja FcγRIIB2 retseptori puhul oli internalisatsioon nõrgem, kuid tekitas rohkelt suuri vesiikleid. D) Inimese türosinaasi ja FcγRIIB2 koosekspressioonil andis antikeha palju

tugevamat signaali, kui ainult retseptoriga. E) Hiire türosinaasi ekspresseerivatel rakkudel oli antikeha roheline signaal rakkude pinnal või vahetult selle all. F) pQMc_TagAc konstruktiga elektroporeeritud rakkude puhul antikeha signaali ei täheldatud. Mõõtejoon 10 μm .

Võrdluseks kasutasime ka 5E11 antikeha (veise papilloomiviiruse E2 valgu mAb), mis ei ole melanoomi-spetsiifiline IgG tüüpi antikeha, et teha kindlaks, et võime siseneda rakkudesse ei tulene antikeha tüübist. Türosinaasi ekspresseerivate rakkude puhul oli antikeha signaal väga nõrgalt detekteeritav raku pinnal (Joonis 13, B), samal ajal kui hiire Fc γ RIIB retseptorit ekspresseerivate rakkude puhul oli see signaal samuti nõrk, aga nii rakkude pinnal, kui ka rakkude sees üksikute väikeste vesiiklitenä (Joonis 13, A). Seda võib pidada 5E11 mittespetsiifiliseks seondumiseks (Joonis 13, A, C). Sarnane tulemus oli näha ka pQMc_mTYR ja pQMc_mFCGRIIB2 konstruktidega üheaegselt elektroporeeritud COS-7 rakkude puhul (Joon 13, C). Tühja vektoriga pQMc_TagAc elektroporeeritud rakkude puhul antikeha signaali ei täheldatud (Joonis 13, D). 5E11 antikeha signaalid olid vaevumärgatavad võrreldes 5A2 antikeha signaaliga.



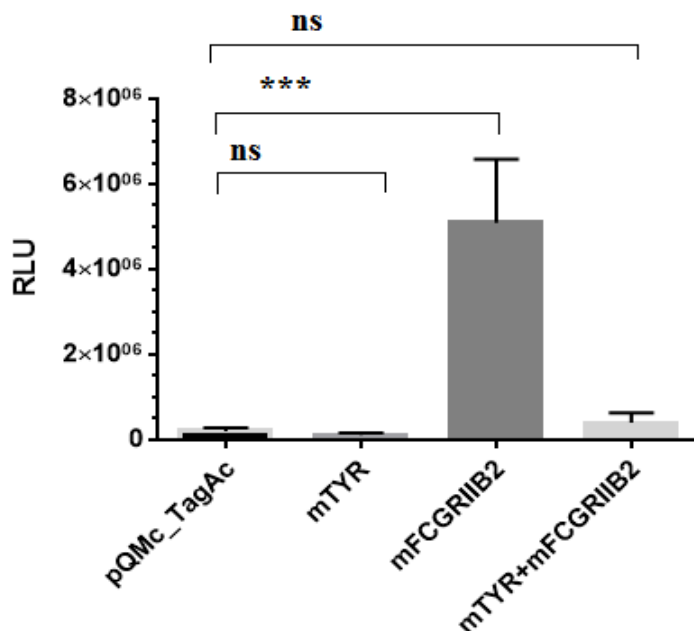
Joonis 13: Hiire ja inimese FcγRIIB2 retseptorite ja türosinaasi ekspresseeriva COS-7 rakkud inkubeerituna isotüüp-kontroll antikehaga 5E11-DL488. A) FcγRIIB2 ekspresseerivatel rakkudel oli antikeha signaal ülimalt nõrk võrreldes 5A2-DL488. Üksikud väikese kolded raku sees viitavad mittespetsiifilisele seondumisele. B) 5E11 ei ole võimeline sisenema türosinaasi ekspresseerivatesse rakkudesse. C) pQMc_mTYR ja pQMc_mFCGRIIB2 konstruktidega elektroporeeritud rakkude puhul oli signaal nii rakkude pinnal, kui ka rakkude sees, kuid väga nõrk. D) pQMc_TagAc elektroporeeritud rakkude puhul antikeha signaali märgata ei olnud. Mõõtjoon 10 μm.

2.3.4. 5A2 internalisatsiooni sõltuvus FcγRIIB2 retseptorist, türosinaasist või nende koossekspressioonist

Selleks, et kvantitatiivselt määrata 5A2 antikeha sisenemist rakkudesse, viidi läbi internalisatsiooni katse 37 °C juures, kasutades 5A2-Gluc antikeha. Sama moodi, nagu

immuunofluorestsents analüüsis, uuriti siin, kuivõrd antikeha sisenemine sõltub FcγRIIB2, türosinaasi või nende mõlema olemasolust rakkudes.

Selgus, et FcγRIIB2 retseptori olemasolu raku pinnal on tähtis 5A2 sisenemiseks rakkudesse, mis on kooskõlas meie immuunofluorestsentsi tulemustega. Statistiline analüüs näitas, et 5A2 internalisatsiooni tase FcγRIIB2 konstruktiga elektroporeeritud COS-7 rakkudesse on oluline ($P < 0,0005$). Türosinaasi ja FcγRIIB retseptori koosinemine küll soodustab veidi internalisatsiooni, aga palju vähem ja statistiliselt mitteolulisel määral võrreldes ainult türosinaasi või negatiivse kontrolli rakkudega. Samal ajal tühja vektori ja ainult türosinaasi ekspresseerivad rakud ei internaliseeri 5A2-Gluc antikeha (Joonis 14).



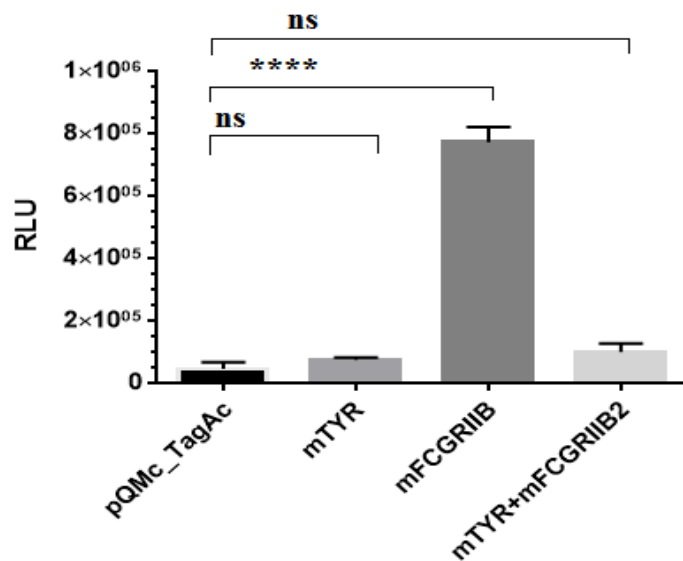
Joonis 14: Internalisatsiooni katse COS-7 rakkudega 37 °C juures. FcγRIIB2 retseptori ekspressioon rakkudes soodustab väga oluliselt 5A2 antikeha sisenemist rakkudesse ($P < 0,0005$). Türosinaasi ja FcγRIIB retseptori koosinemine küll soodustab veidi internalisatsiooni, aga statistiliselt mitteolulisel määral. Eraldi tühja vektoriga ja türosinaasiga elektroporeeritud rakkude puhul oli antikeha internalisatsiooni efektiivsus peaaegu olematu.

2.3.5. 5A2 antikeha siseneb rakkudesse endotsütoosi teel

Samuti oli vaja teha kindlaks, millise mehhanismi kaudu 5A2 antikeha siseneb rakku, ehk kas tegu on aktiivse transpordiga. Kuna oli kindlaks tehtud, et antikeha sisenemises rakku mängib tähtsat rolli FcγRIIB2 retseptor (endotsütootiline retseptor), korraldati internalisatsiooni katset ka 4 °C juures.

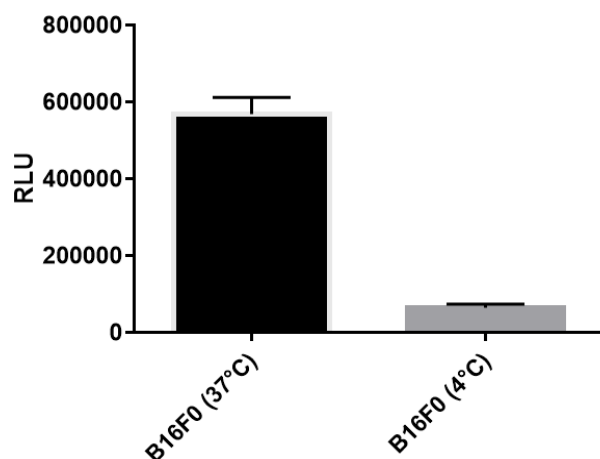
Tulemuste muster oli sama nagu ka 37 °C juures (Joonis 15), aga 4 °C juures oli internalisatsioon viis korda madalam, võrreldes 37 °C juures saadud tulemustega (Lisa 2). 4 °C katse puhul internaliseerub vaid niipalju antikeha kui on seondunud raku pinnale tunni aja jooksul jääl. Samal ajal kui 37 °C juures internaliseerub antikeha pidevalt juurde.

5A2 sisenemine rakkudesse on temperatuurist sõltuv, seega on tegemist endotsütoosi protsessiga (Weigel and Oka 1981; E. Holtzman „Lysosomes“).



Joonis 15: Internalisatsiooni katse COS-7 rakkudega 4 °C juures. FcγRIIB2 retseptori esinemine soodustab 5A2 sisenemist rakkudesse. Tulemus on statistiliselt usaldusväärne ($P < 0,0001$). Türosinaasi ja FcγRIIB2 retseptori koosesinemine veidi mõjutab antikeha sisenemist rakkudesse, kuid statistiliselt mitteoluliselt. Nii türosinaas üksi kui ka tühi vektor ei mõjuta peaaegu üldse 5A2 sisenemist rakkudesse.

Võrdluseks sai samu katsed korratud ka B16F0 rakkudega, mis natiivselt ekspresseerivad FcγRIIB ja türosinaasi. Saadud tulemused langesid kokku olemasolevate COS-7 rakkude tulemustega (Joonis 16).



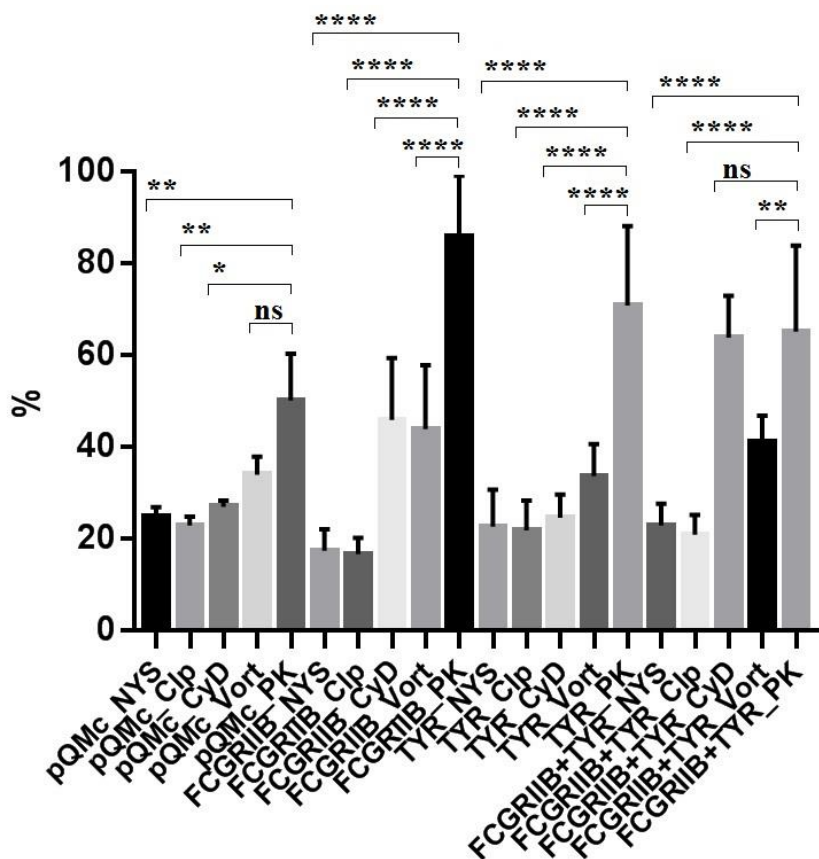
Joonis 16: Internalisatsiooni katse tulemuste võrdlus B16F0 rakkudega. Tulemused näitavad, et ka B16F0 rakkude puhul on 4 °C juures internalisatsioon kordades madalam, kui 37 °C juures ehk tegu on aktiivse transpordiga.

2.3.6. Inhibiitorite mõju 5A2 antikeha internalisatsioonile

Järgmise etapina taheti teada saada, millise endotsütoosi raja kaudu 5A2 siseneb rakkudesse. Selleks viidi läbi internalisatsiooni katse 4 °C juures inhibiitorite juuresolekul.

Katses kasutati samade konstruktidega elektroporeeritud COS-7 rakke, mis töödeldi inhibiitoritega: nüstatiin, tsütohalasiin D, vortmanniin, kloorpromaziin. Edaspidi inkubeeriti rakke 5A2-Gluc antikeha juuresolekul.

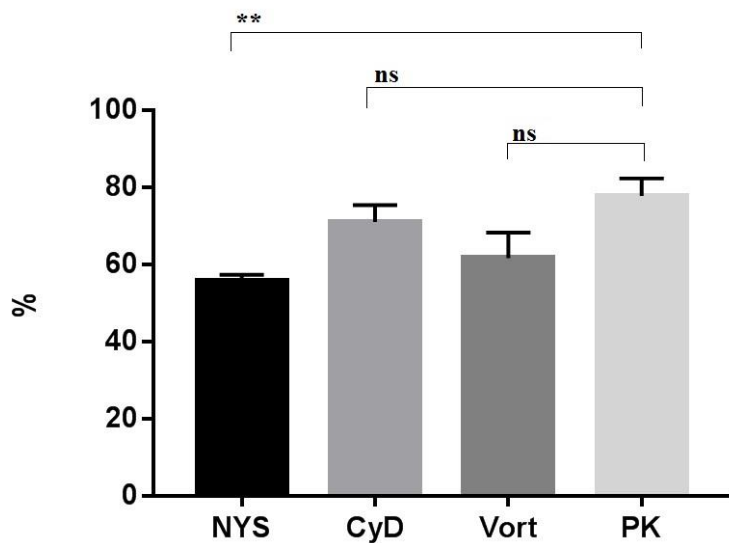
Tulemustest selgus, et 5A2 antikeha sisenemist rakkudesse mõjutas kõige rohkem nüstatiin ($P < 0,0001$) ja kloorpromaziin ($P < 0,0001$) (Joonis 17). Nagu ülalpool mainitud, nüstatiin inhibeerib kaveool-sõltuvat endotsütoosi, aga kloorpromaziin – klatriin-sõltuvat endotsütoosi.



Joonis 17: Internalisatsiooni katse tulemused COS-7 rakkudega. Kõige tugevamat mõju 5A2-Gluc internalisatsioonile avaldasid nüstatiin ja kloorpromasiin. Tulemus on statistiliselt oluline. Samal ajal kui tsütohalasiin D ja vortmanniin peaaegu ei avaldanud mingit mõju internalisatsioonile. Iga proovi jaoks tehti kuus kordust.

Võrdluseks viidi sama katse läbi ka B16F0 rakkudega 4 °C juures.

Selle katse tulemused näitasid, et ka 5A2-GLuc sisenemine rakkudesse oli enim inhibeeritud nüstatiiini poolt ($P < 0,0045$). Lisaks inhibeeris vortmanniin vähesel määral, kuid jäi siiski statistiliselt mitteoluliseks ($P < 0,0645$) (Joonis 18).

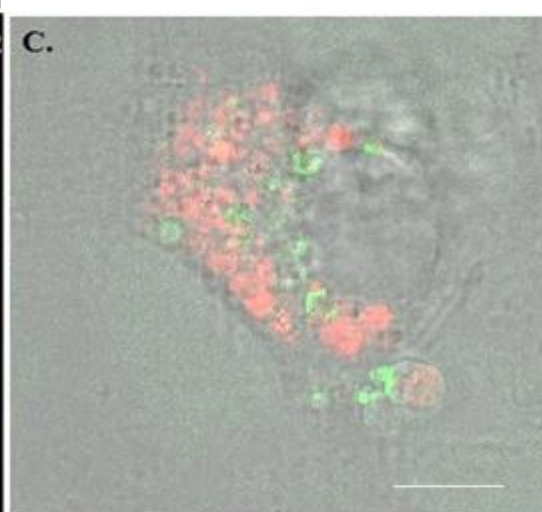
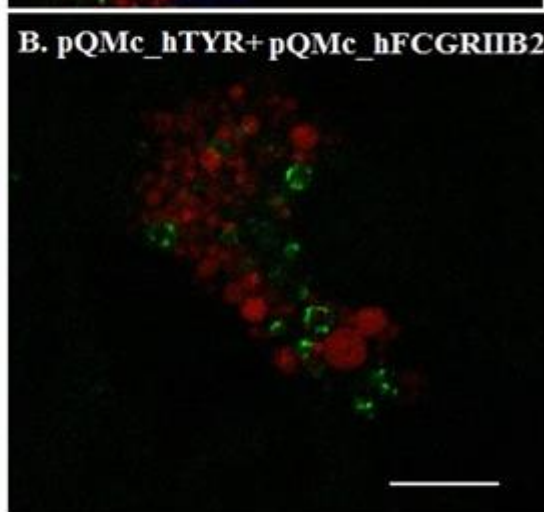
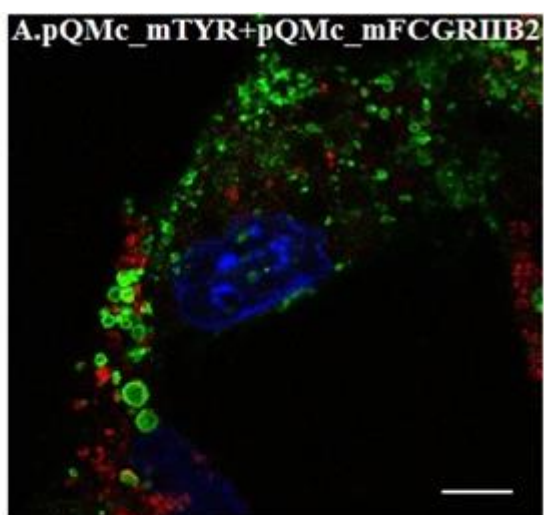


Joonis 18: Internalisatsiooni katse B16F0 rakkudega 4 °C juures, kasutades inhibiitoreid. 5A2 internalisatsioonile avaldas kõige tugevamat mõju nüstatiin, vähesel määral vortmanniin (statistiliselt mitteoluline).

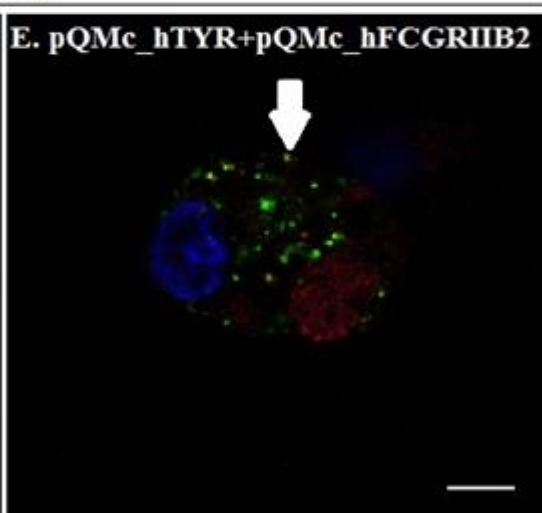
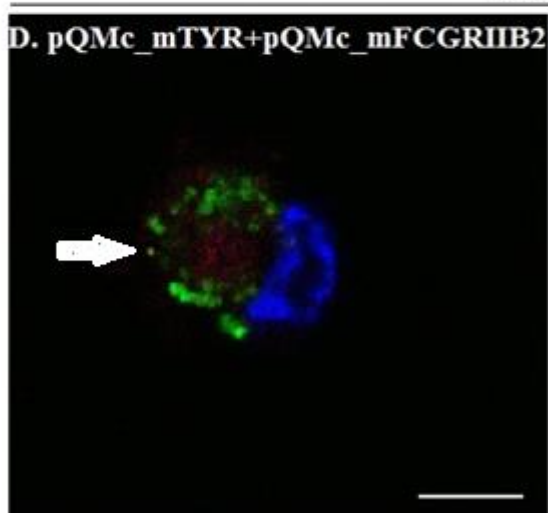
2.3.7. FcγRIIB2 ja türosinaasi olemasolul internaliseerunud 5A2 mAb ei lähe lüisosoomidesse

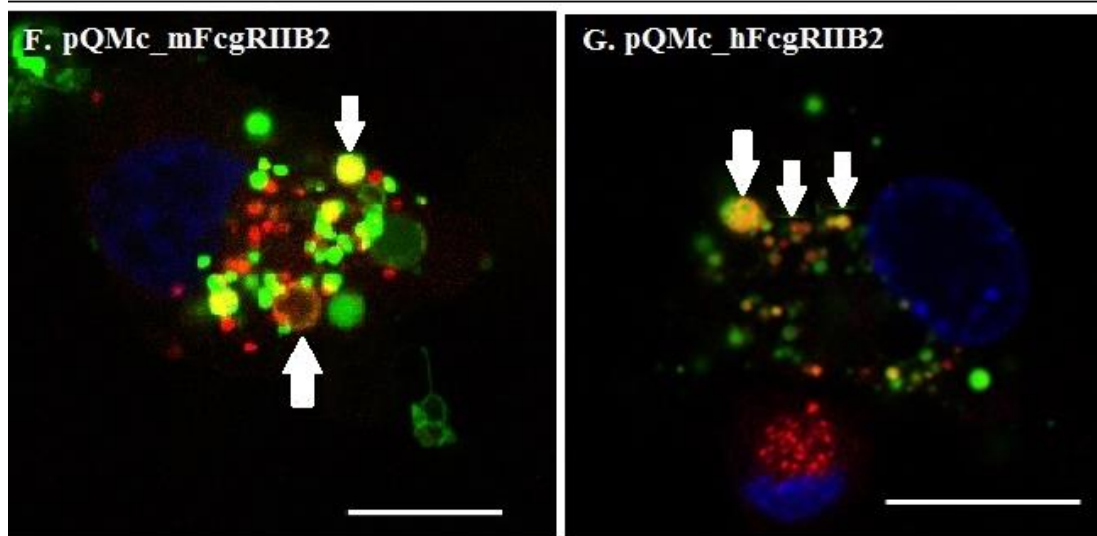
4 tundi peale 5A2-DL488 lisamist ei esinenud kolokalisatsiooni LysoTrackeri punase signaaliga ei hiire (Joonis 19, A) ega ka inimese (Joonis 19, B) retseptori ning türosinaasi koos-ekspresseerivates COS-7 rakkudes. Pärast 18 tunnilist inkubeerimist olid eristatavad üksikud kolokalisatsiooni kolded inimese (Joonis 19, E, valge nool) ja hiire (Joonis 19, D, valge nool) retseptori ja türosinaasi konstruktidega elektroporeeritud rakkude puhul, mis tähendab, et vähene osa antikehast suunatakse selleks ajaks degradeerimisele, kuid suurem osa jääb siiski jätkuvalt eraldi vesiiklitesse. Vastupidised olid tulemused ainult inimese või hiire retseptorit ekspresseerivate rakkude puhul. Esines palju suuri mAb ja LysoTrackeri kolokalisatsiooni koldeid (Joonis 19, F ja G).

5A2
4h



5A2 18h





Joonis 19: 5A2-DL488 ja lüüsoosoomide asukoha detekteerimine elektroporeeritud COS-7 rakkudes. A) Hiire türosinaasi ja FcγRIIB2 retseptorit koos-ekspressseerivate rakkude puhul ei esinenud mAb ja LysoTrackeri punase signaali kolokalisatsiooni (4 tundi peale 5A2-DL488 lisamist). B) Inimese türosinaasi ja FcγRIIB2 ekspresseerivate rakkude puhul ei olnud samuti LysoTracker ja rohelise (5A2) signaali kolokalisatsiooni (4 tundi peale 5A2-DL488 lisamist). C) Pildi B must-valge versioon (tuuma asukoha näitamiseks). D) Hiire türosinaasi ja FcγRIIB2 konstruktidega elektroporeeritud rakkude puhul olid näha üksikud kolokalisatsiooni kolded (18 tundi peale 5A2-DL488 lisamist). E) Inimese türosinaasi ja FcγRIIB2 retseptorit ekspresseerivate rakude puhul esinesid üksikud LysoTrackeri ja 5A2-DL488 kolokalisatsiooni kolded (18 tundi peale mAb lisamist). F) Hiire FcγRIIB2 retseptori konstruktiga elektroporeeritud rakkudesoli näha palju LysoTrackeri ja mAb kolokalisatsiooni koldeid (18 tundi peale 5A2 lisamist). G) Inimese türosinaasi ja FcγRIIB2 retseptorit ekspresseerivates rakkudes esines suures hulgas kolokalisatsiooni piirkondi (18 tundi peale mAb lisamist). Valge noolega on tähistatud kolokalisatsiooni kolded. Mõõtjoon 10 µm.

2.4. Arutelu

Ülalpool kirjeldatud katsed on ainult väike osa suurest projektist, mille eesmärk on vaadelda 5A2 melanoomispetsiifilise türosinaasi-vastase antikeha toimemehhanismi. See antikeha on võimeline mitte ainult inhibeerima melanoomirakkude proliferatsiooni, vaid ka viimaste andmete alusel internaliseeruma melanoomi rakkudesse (andmed on saadatud publitseerimisele). Eelnevalt oli teada, et paljud kasvajakud ekspresseerivad FcγRIIB retseptoreid oma plasmamembraanil ja üks selle vormidest – FcγRIIB2 – omab nii raku kasvu pärssivat toimet seondudes mõne antikehaga, kuid on ka endotsütootiline retseptor (Miettinen *et al.* 1989). Seetõttu pakuti välja võimaluse, et 5A2 antikeha internaliseerub just selle retseptori kaudu. Tähtis oli välja selgitada kuivõrd selle antikeha sisenemisvõime sõltub antud retseptorist, türosinaasist või nende mõlema koos-ekspressioonist rakus.

Esiteks oli vaja välja selgitada, kas Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudi laboris kasutusel olevad melanoomi rakuliinid ekspresseerivad FcγRIIB retseptorit ja türosinaasi. Oluline oli saada kinnitust väitele, et paljudes metastaatilistes melanoomides on neid valke (Cassard, Cohen-Solal *et al.* 2008; Brichard, Van Pel *et al.* 1993) ja valida edasiste katsete jaoks sobivad rakuliinid. WB tulemustest saadi teada, et kõik katseks välja valitud melanoomi rakuliinid ekspresseerivad nii FcγRIIB retseptorit kui ka türosinaasi.

Kuna 5A2 mAb on melanoomispetsiifiline türosinaasi-vastane antikeha ja eeldati, et selle toimemehhanism sõltub FcγRIIB retseptori olemasolust, loodi mudel, mille abil seda hüpoteesi võiks testida. Olemas oli varem kloneeritud hiire FcγRIIB (Gerulis, Bakalaureuse töö, 2013). Selleks, et lisada ka inimese retseptorid analüüsi, oli vaja isoleerida FcγRIIB järjestus lümfotsüütidest, kloneerida ekspressioonivektorisse ja viia see sisse rakuliini, mis seda retseptorit natiivselt ei ekspresseeri. Valiti selle jaoks COS-7 rakuliini, kuna WB tulemuste alusel ei sünteesinud selle rakud ei türosinaasi ega ka FcγRIIB retseptorit. Saadud konstruktid ja ka varem olemasolevad hiire FcγRIIB2 ning mõlema liigi türosinaasi järjestusi kodeerivad plasmiidid kontrolliti COS-7 elektroporatsioonil ja WB-l. Kõik nimetatud valgud oli WB-l kenasti detekteeritavad.

Immuonofluorestsentsi analüüsil COS-7 rakkudes, mis ekspresseerisid ainult türosinaasi, jäi 5A2-DL488 raku pinnale või vahetult selle alla ning ei olnud efektiivselt võimeline sisenema rakku. Samal ajal ainult FcγRIIB2 retseptori või retseptori ja türosinaasiga koos-ekspressiooni puhul oli see võimeline edukalt sisenema rakku, tekitades erineva suurusega vesiikleid (mis

varieerusid üliväikestest mullidest kuni 10 µm diameetriga mullideni) ja jõudsid tuuma lähedusse suhteliselt lühikese aja jooksul (1 tund). See tähendab, et FcγRIIB2 olemasolu rakkude pinnal soodustab 5A2 sisenemist rakkudesse. Tühja vektoriga elektroporeeritud rakkude puhul, nagu ka eeldati, ei olnud antikeha signaal detekteeritav.

Kuna CD32B ekspressioon rakkudes soodustas antikeha sisenemist, oli vaja edaspidi välja selgitada, kas internalisatsioon on immuunoglobuliini isotüübiga seotud. Võrdluseks kasutati IgG1 isotüübi mittespetsiifilist 5E11 antikeha. Immuonofluorestsents analüüs näitas, et see antikeha ei ole võimeline rakkudesse sisenema. Rakkudel olid üksikud 5E11-DL488 kolded, aga need olid oletatavasti tingitud mittespetsiifilistest seondumistest. Seega on rakkudesse internaliseerumine 5A2 eripära.

Kuna antikeha on võimeline rakkudesse sisenema, taheti teada saada, millise mehhanismi kaudu see toimub – kas tegu on passiivse või aktiivse protsessiga. Selleks viidi läbi internalisatsiooni katse, kus kasutati Icosagen OÜ poolt valmistatud 5A2-Gluc antikeha. Kuna mõnede andmete alusel on FcγRIIB2 endotsütootiline retseptor (Van Den Herik-Oudijk *et al.* 1994; Miettinen *et al.* 1989), siis oletati, et 5A2 siseneb rakkudesse just selle protsessi kaudu ja saadi sellele ka kinnitust. Edasi taheti välja selgitada, mis tüüpi endotsütoosiga on tegu. Selle väljaselgitamiseks kasutatud inhibiitoritest avaldasid suurimat mõju nüstatiin ja kloorpromaziin. Nüstatiin on võimeline inhibeerima kaveoliin-vahendatud endotsütoosi ja kloorpromaziin – klatriin-sõltuvat endotsütoosi ehk 5A2 antikeha sisenemisel rakku võib olla tegu just nende protsessidega. Vaatamata sellele, et tsütohalasiin D ja vortmanniin ei avaldanud märkimisväärset mõju internalisatsiooni efektiivsusele, oli immuonofluorestsents analüüsil näha suurte (kuni 10 µm diameetriga) vesiiklite teke, mis võiks tähendada, et tegu on hoopis makropinotsütoosiga. Nende inhibiitorite mitteolulist mõju võib seletada sellega, et ükski inhibiitoritest ei ole ühegi raja suhtes absoluutselt spetsiifiline. Nad kõik omavad mõningaid kõrvalmõjusid. Ja kuna üks rada on inhibeeritud, siis suure tõenäosusega lülitub sisse teine alternatiivne rada, mis hakkab hoidma internalisatsiooni vajalikul tasemel.

Seega, saadi teada kaks inhibiitorit, mis avaldasid enim mõju 5A2 antikeha sisenemisprotsessile rakkudesse. Nende inhibiitoritega võib teha ka edaspidiseid analüüse. Näiteks kui 5A2 külge seostada mingi toksiline agent ja kasutada seda internalisatsiooni katsetes inhibiitoritega.

Lisaks võiks teha katseid erinevate markeritega: vaadelda 5A2 antikeha, klatriini ja kaveoliini asukohta rakus (kasutades vastavalt klatriini- ja kaveoliini-vastaseid antikehi) ning kasutada markereid lüsoosoomide, varaste ja hiliste endosoomide jaoks.

KOKKUVÕTE

5A2 mAb on melanoomispetsiifiline türosinaasi-vastane antikeha, mis suudab pärssida selle tuumori rakkude kasvu nii loomudelil kui ka koekultuuris ehk siis tingimustes, kus muud immuunsüsteemi komponendid puuduvad. See on algselt IgG1 tüüpi antikeha, mis tunneb ära spetsiifilise epitoobi türosinaasi järjestuses, mis asub 229-241 aminohapete vahemikus.

Viimaste analüüside käigus on selgunud, et see mAb on võimeline sisenema melanoomi rakkudesse endotsütootilise mehhanismi kaudu. Läbiviidud uuringud näitasid, et FcγRIIB2 retseptorite olemasolu soodustab antud protsessi ja teeb selle efektiivsemaks, samal ajal kui ainult türosinaasi ekspresseerivate rakkude puhul seda ei täheldatud. Tulemused on olulised ravimiarenduse seisukohast, kus tuumori-spetsiifilise antikeha külge seotud toksiline ühend peab oma toime saavutamiseks jõudma raku sisse. Sarnane olukord on ka antikeha külge disainitud ensüümiga, mis mittetoksilise madalmolekulaarse aine, mis ravitavale süstitakse, muudaks toksilisteks ühenditeks ainult tuumori rakkudes, jättes normaalsed rakud kahjustamata.

Investigation of internalization mechanisms of anti-melanoma antigen tyrosinase antibody

Summary

Oksana Gerulis

5A2 mAb is a melanoma-specific anti-tyrosinase antibody, that is able to inhibit the proliferation of tumor cells in animal model and also in the cell culture, it means under conditions, where other components of immune system are absent. It is an IgG1 isotype antibody, that recognizes specific epitope in tyrosinase sequence. This region is located in the range of 229-249 amino acids.

Recent analyses have revealed, that this mAb is also able to internalize into melanoma cells via endocytic mechanism. Our studies showed, that this process was promoted in the presence of FcγRIIB2 receptor. These receptors make this process more efficient, while by only tyrosinase-expressing cells we did not observe that.

Results are important for the drug development, because a toxic compound, that is bound to antibody, needs to get into the cell to achieve the effect. The same circumstances are also with an antibody conjugated to an enzyme, that should turn non-toxic prodrug to toxic product(s) only as it enters the tumor cells.

Tänuavaldused

Soovin tänada oma juhendajat Nele Jaansonit, kes oli alati abivalmis, toetav ning vajadusel ka kriitiline.

Olulise tänu avaldan ka prof. Margus Poogale, kes ei pidanud paljaks kulutada oma aega minu töösse süvenemiseks, andis soovitusi endotsütoosi katseteks ning aitas ka neid lahti mõtestada.

Lisaks tänan Icosagen AS kollektiivi, kelle poolt oli toodetud 5A2-GLuc antikeha.

Samuti kõiki teisi, kes aitasid antud tööil valmida.

Kasutatud kirjanduse loetelu

- Aderem, A. and D. M. Underhill (1999). "Mechanisms of phagocytosis in macrophages." *Annu Rev Immunol* 17: 593-623.
- Ahmed, A. A., J. Giddens, A. Pincetic, J. V. Lomino, J. V. Ravetch, L. X. Wang and P. J. Bjorkman (2014). "Structural characterization of anti-inflammatory immunoglobulin G Fc proteins." *J Mol Biol* 426(18): 3166-3179.
- Amigorena, S., C. Bonnerot, J. R. Drake, D. Choquet, W. Hunziker, J. G. Guillet, P. Webster, C. Sautes, I. Mellman and W. H. Fridman (1992). "Cytoplasmic domain heterogeneity and functions of IgG Fc receptors in B lymphocytes." *Science* 256(5065): 1808-1812
- Aroca, P., F. Solano, J. C. Garcia-Borron and J. A. Lozano (1991). "Specificity of dopachrome tautomerase and inhibition by carboxylated indoles. Considerations on the enzyme active site." *Biochem J* 277 (Pt 2): 393-397.
- Artalejo, C. R., A. Elhamdani and H. C. Palfrey (2002). "Sustained stimulation shifts the mechanism of endocytosis from dynamin-1-dependent rapid endocytosis to clathrin- and dynamin-2-mediated slow endocytosis in chromaffin cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(9): 6358-6363.
- Bajetta, E., M. Del Vecchio, C. Bernard-Marty, M. Vitali, R. Buzzoni, O. Rixe, P. Nova, S. Aglione, S. Taillibert and D. Khayat (2002). "Metastatic melanoma: chemotherapy." *Semin Oncol* 29(5): 427-445.
- Barth, A., L. A. Wanek and D. L. Morton (1995). "Prognostic factors in 1,521 melanoma patients with distant metastases." *J Am Coll Surg* 181(3): 193-201.
- Boon, T., J. C. Cerottini, B. Van den Eynde, P. van der Bruggen and A. Van Pel (1994). "Tumor antigens recognized by T lymphocytes." *Annu Rev Immunol* 12: 337-365.
- Braslawsky G.R., Yaackubowicz M., Frensdorff A., Witz I.P. (1976). Receptors for immune complexes on cells within a non-lymphoid murine tumor. *J Immunol.*, Jun;116(6):1571-8.
- Brichard, V., A. Van Pel, T. Wolfel, C. Wolfel, E. De Plaen, B. Lethe, P. Coulie and T. Boon (1993). "The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas." *J Exp Med* 178(2): 489-495.
- Cassard, L., J. F. Cohen-Solal, E. M. Fournier, S. Camilleri-Broet, A. Spatz, S. Chouaib, C. Badoual, A. Varin, S. Fisson, P. Duvillard, C. Boix, S. M. Loncar, X.

Sastre-Garau, A. N. Houghton, M. F. Avril, I. Gresser, W. H. Fridman and C. Sautes-Fridman (2008). "Selective expression of inhibitory Fcγ receptor by metastatic melanoma impairs tumor susceptibility to IgG-dependent cellular response." *Int J Cancer* 123(12): 2832-2839.

- Cavalli, V., M. Corti and J. Gruenberg (2001). "Endocytosis and signaling cascades: a close encounter." *FEBS Lett* 498(2-3): 190-196.
- Chan, K. R., E. Z. Ong, D. Z. Mok and E. E. Ooi (2015). "Fc receptors and their influence on efficacy of therapeutic antibodies for treatment of viral diseases." *Expert Rev Anti Infect Ther* 13(11): 1351-1360.
- Chang, A. E., L. H. Karnell and H. R. Menck (1998). "The National Cancer Data Base report on cutaneous and noncutaneous melanoma: a summary of 84,836 cases from the past decade. The American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Cancer Society." *Cancer* 83(8): 1664-1678.
- Conner, S. D. and S. L. Schmid (2003). "Regulated portals of entry into the cell." *Nature* 422(6927): 37-44.
- Costin, G. E. and V. J. Hearing (2007). "Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress." *FASEB J* 21(4): 976-994.
- Crosby, T., R. Fish, B. Coles and M. D. Mason (2000). "Systemic treatments for metastatic cutaneous melanoma." *Cochrane Database Syst Rev*(2): CD001215.
- Crott, R. (2004). "Cost effectiveness and cost utility of adjuvant interferon alpha in cutaneous melanoma: a review." *Pharmacoeconomics* 22(9): 569-580.
- Daeron, M. (1997). "Fc receptor biology." *Annu Rev Immunol* 15: 203-234.
- del Marmol, V. and F. Beermann (1996). "Tyrosinase and related proteins in mammalian pigmentation." *FEBS Lett* 381(3): 165-168.
- Ehrlich, P. (1906). A general review of the recent work in immunity. *Collected studies of immunity*: 577-586.
- Eton, O., S. S. Legha, T. E. Moon, A. C. Buzaid, N. E. Papadopoulos, C. Plager, A. M. Burgess, A. Y. Bedikian, S. Ring, Q. Dong, A. B. Glassman, C. M. Balch and R. S. Benjamin (1998). "Prognostic factors for survival of patients treated systemically for disseminated melanoma." *J Clin Oncol* 16(3): 1103-1111.
- Ferrini, U., A. M. Mileo and V. J. Hearing (1987). "Microheterogeneity of melanosome-bound tyrosinase from the Harding-Passey murine melanoma." *Int J Biochem* 19(3): 227-234.

- Fidler, I. J. (1973). "Selection of successive tumour lines for metastasis." *Nat New Biol* 242(118): 148-149.
- Fidler, I. J. (1975). "Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo." *Cancer Res.* 1975 Jan;35(1):218-24.
- Flaherty, K. T., I. Puzanov, K. B. Kim, A. Ribas, G. A. McArthur, J. A. Sosman, P. J. O'Dwyer, R. J. Lee, J. F. Grippo, K. Nolop and P. B. Chapman (2010). "Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma." *N Engl J Med* 363(9): 809-819.
- Gerber, J. S. and D. M. Mosser (2001). "Stimulatory and inhibitory signals originating from the macrophage Fcγ receptors." *Microbes Infect* 3(2): 131-139.
- Gerulis, O. (2013). Bakalaureusetöö. "FcγRIIB roll melanoomi inhibeerimisel."
- Harpaz, Y. and C. Chothia (1994). "Many of the immunoglobulin superfamily domains in cell adhesion molecules and surface receptors belong to a new structural set which is close to that containing variable domains." *J Mol Biol* 238(4): 528-539.
- Hearing, V. J., T. M. Ekel and P. M. Montague (1981). "Mammalian tyrosinase: isozymic forms of the enzyme." *Int J Biochem* 13(1): 99-103.
- Hearing, V. J., Jr., T. M. Ekel, P. M. Montague, E. D. Hearing and J. M. Nicholson (1978). "Mammalian tyrosinase: isolation by a simple new procedure and characterization of its steric requirements for cofactor activity." *Arch Biochem Biophys* 185(2): 407-418.
- Hearing, V. J., J. M. Nicholson, P. M. Montague, T. M. Ekel and K. J. Tomecki (1978). "Mammalian tyrosinase. Structural and functional interrelationship of isozymes." *Biochim Biophys Acta* 522(2): 327-339.
- Helenius, A. (1994). "How N-linked oligosaccharides affect glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum." *Mol Biol Cell.* 1994 Mar; 5(3): 253-265.
- Hillaireau, H. and P. Couvreur (2009). "Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery." *Cell Mol Life Sci* 66(17): 2873-2896.
- Hillner, B. E., S. Agarwala and M. R. Middleton (2000). "Post hoc economic analysis of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of advanced metastatic melanoma." *J Clin Oncol* 18(7): 1474-1480.
- Hinshaw, J. E. (2000). "Dynamin and its role in membrane fission." *Annu Rev Cell Dev Biol* 16: 483-519.
- Hodi, F. S., S. J. O'Day, D. F. McDermott, R. W. Weber, J. A. Sosman, J. B. Haanen, R. Gonzalez, C. Robert, D. Schadendorf, J. C. Hassel, W. Akerley, A. J. van den

Eertwegh, J. Lutzky, P. Lorigan, J. M. Vaubel, G. P. Linette, D. Hogg, C. H. Ottensmeier, C. Lebbe, C. Peschel, I. Quirt, J. I. Clark, J. D. Wolchok, J. S. Weber, J. Tian, M. J. Yellin, G. M. Nichol, A. Hoos and W. J. Urba (2010). "Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma." *N Engl J Med* 363(8): 711-723.

- Hulett, M. D. and P. M. Hogarth (1994). "Molecular basis of Fc receptor function." *Adv Immunol* 57: 1-127.
- Inoue, H., Nojima, H. and H. Okayama (1990). "High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids." *Gene* Nov 30;96(1):23-8.
- Ivanov, A. I. (2008). "Pharmacological inhibition of endocytic pathways: is it specific enough to be useful?" *Methods Mol Biol* 440: 15-33.
- Ivry, G. B., C. A. Ogle and E. K. Shim (2006). "Role of sun exposure in melanoma." *Dermatol Surg* 32(4): 481-492.
- Jaanson, N., K. Moll, A. Kulla and M. Ustav (2003). "Identification of the immunodominant regions of the melanoma antigen tyrosinase by anti-tyrosinase monoclonal antibodies." *Melanoma Res* 13(5): 473-482.
- Jimenez, M., K. Kameyama, W. L. Maloy, Y. Tomita and V. J. Hearing (1988). "Mammalian tyrosinase: biosynthesis, processing, and modulation by melanocyte-stimulating hormone." *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(11): 3830-3834.
- Kang J. H., Chung J.-K. (2008) Molecular-Genetic Imaging Based on Reporter Gene Expression. *The Journal of Nuclear Medicine* 49: 164-179.
- Kim, C. J., S. Dessureault, D. Gabrilovich, D. S. Reintgen and C. L. Slingluff, Jr. (2002). "Immunotherapy for melanoma." *Cancer Control* 9(1): 22-30.
- Kirkham, M., A. Fujita, R. Chadda, S. J. Nixon, T. V. Kurzchalia, D. K. Sharma, R. E. Pagano, J. F. Hancock, S. Mayor and R. G. Parton (2005). "Ultrastructural identification of uncoated caveolin-independent early endocytic vehicles." *J Cell Biol* 168(3): 465-476.
- Kobayashi, N., A. Nakagawa, T. Muramatsu, Y. Yamashina, T. Shirai, M. W. Hashimoto, Y. Ishigaki, T. Ohnishi and T. Mori (1998). "Supranuclear melanin caps reduce ultraviolet induced DNA photoproducts in human epidermis." *J Invest Dermatol* 110(5): 806-810.
- Kruth, H. S., N. L. Jones, W. Huang, B. Zhao, I. Ishii, J. Chang, C. A. Combs, D. Malide and W. Y. Zhang (2005). "Macropinocytosis is the endocytic pathway that

mediates macrophage foam cell formation with native low density lipoprotein." *J Biol Chem* 280(3): 2352-2360.

- Kwon, B. S., A. K. Haq, S. H. Pomerantz and R. Halaban (1987). "Isolation and sequence of a cDNA clone for human tyrosinase that maps at the mouse c-albino locus." *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(21): 7473-7477.
- Lamaze, C. and S. L. Schmid (1995). "The emergence of clathrin-independent pinocytic pathways." *Curr Opin Cell Biol* 7(4): 573-580.
- Langel, K. (2014) Doktoritöö "Cell-penetrating peptide mechanism studies: from peptides to cargo delivery".
- Latour, S., W. H. Fridman and M. Daeron (1996). "Identification, molecular cloning, biologic properties, and tissue distribution of a novel isoform of murine low-affinity IgG receptor homologous to human Fc gamma RIIB1." *J Immunol* 157(1): 189-197.
- Lee, M. L., K. Tomsu and K. B. Von Eschen (2000). "Duration of survival for disseminated malignant melanoma: results of a meta-analysis." *Melanoma Res* 10(1): 81-92.
- Lens, M. B. and M. Dawes (2004). "Global perspectives of contemporary epidemiological trends of cutaneous malignant melanoma." *Br J Dermatol* 150(2): 179-185.
- Luke, J. J. and G. K. Schwartz (2013). "Chemotherapy in the management of advanced cutaneous malignant melanoma." *Clin Dermatol* 31(3): 290-297.
- Matoba, Y., T. Kumagai, A. Yamamoto, H. Yoshitsu and M. Sugiyama (2006). "Crystallographic evidence that the dinuclear copper center of tyrosinase is flexible during catalysis." *J Biol Chem* 281(13): 8981-8990.
- Miettinen, H. M., J. K. Rose and I. Mellman (1989). "Fc receptor isoforms exhibit distinct abilities for coated pit localization as a result of cytoplasmic domain heterogeneity." *Cell* 58(2): 317-327.
- Mukherjee, S., R. N. Ghosh and F. R. Maxfield (1997). "Endocytosis." *Physiol Rev* 77(3): 759-803.
- Muretto, P. (2001)
- Nimmerjahn, F. and J. V. Ravetch (2005). "Divergent immunoglobulin g subclass activity through selective Fc receptor binding." *Science* 310(5753): 1510-1512.
- Nimmerjahn, F. and J. V. Ravetch (2008). "Fcgamma receptors as regulators of immune responses." *Nat Rev Immunol* 8(1): 34-47.

- Nimmerjahn, F. and J. V. Ravetch (2011). "FcγRs in health and disease." *Curr Top Microbiol Immunol* 350: 105-125.
- Oh, P., D. P. McIntosh and J. E. Schnitzer (1998). "Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium." *J Cell Biol* 141(1): 101-114.
- Olivares, C. and F. Solano (2009). "New insights into the active site structure and catalytic mechanism of tyrosinase and its related proteins." *Pigment Cell Melanoma Res* 22(6): 750-760.
- Parton, R. G., B. Joggerst and K. Simons (1994). "Regulated internalization of caveolae." *J Cell Biol* 127(5): 1199-1215.
- Patel, D., Bassi, R., Hooper, A.T., Sun, H., Huber, J., Hicklin, D.J. and X. Kang (2008). "Enhanced Suppression of Melanoma Tumor Growth and Metastasis by Combined Therapy with Anti-VEGF Receptor and Anti-TYRP-1/gp75 Monoclonal Antibodies". *Anticancer Research* 28: 2679-2686
- Pisani, P., F. Bray and D. M. Parkin (2002). "Estimates of the world-wide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population." *Int J Cancer* 97(1): 72-81.
- Rathnayaka T., Tawa M., Sohya S., Yohda M., Kuroda Y. (2010) Biophysical characterization of highly active recombinant Gaussia luciferase expressed in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1804(9): 1902-1907.
- Ravetch, J. V. and J. P. Kinet (1991). "Fc receptors." *Annu Rev Immunol* 9: 457-492.
- Ravetch, J. V. and L. L. Lanier (2000). "Immune inhibitory receptors." *Science* 290(5489): 84-89.
- Riker, A. I., S. Radfar, S. Liu, Y. Wang and H. T. Khong (2007). "Immunotherapy of melanoma: a critical review of current concepts and future strategies." *Expert Opin Biol Ther* 7(3): 345-358.
- Robbins, P. F., M. el-Gamil, Y. Kawakami, E. Stevens, J. R. Yannelli and S. A. Rosenberg (1994). "Recognition of tyrosinase by tumor-infiltrating lymphocytes from a patient responding to immunotherapy." *Cancer Res* 54(12): 3124-3126.
- Romer, W., L. Berland, V. Chambon, K. Gaus, B. Windschiegel, D. Tenza, M. R. Aly, V. Fraissier, J. C. Florent, D. Perrais, C. Lamaze, G. Raposo, C. Steinem, P. Sens, P. Bassereau and L. Johannes (2007). "Shiga toxin induces tubular membrane invaginations for its uptake into cells." *Nature* 450(7170): 670-675.

- Rothberg, K. G., J. E. Heuser, W. C. Donzell, Y. S. Ying, J. R. Glenney and R. G. Anderson (1992). "Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats." *Cell* 68(4): 673-682.
- Schroeder, H. W., Jr. and L. Cavacini (2010). "Structure and function of immunoglobulins." *J Allergy Clin Immunol* 125(2 Suppl 2): S41-52.
- Schmitt, D.A., Hanau, D., Bieber, T., Dezutter-Dambuyant, C., Schmitt, D., Fabre, M., Pauly, G., Cazenave, J.P. "Human epidermal Langerhans cells express only the 40-kilodalton Fc γ receptor(FcRII)," *Journal of Immunology*, vol. 144, no. 11, pp. 4284–4890
- Schur, P. H. (1988). "IgG subclasses. A historical perspective." *Monogr Allergy* 23: 1-11.
- Smith, K. A., P. N. Nelson, P. Warren, S. J. Astley, P. G. Murray and J. Greenman (2004). "Demystified...recombinant antibodies." *J Clin Pathol* 57(9): 912-917.
- Sun, P., H. Yamamoto, S. Suetsugu, H. Miki, T. Takenawa and T. Endo (2003). "Small GTPase Rah/Rab34 is associated with membrane ruffles and macropinosomes and promotes macropinosome formation." *J Biol Chem* 278(6): 4063-4071.
- Thomson, T. M., M. J. Mattes, L. Roux, L. J. Old and K. O. Lloyd (1985). "Pigmentation-associated glycoprotein of human melanomas and melanocytes: definition with a mouse monoclonal antibody." *J Invest Dermatol* 85(2): 169-174.
- Topalian, S. L., L. Rivoltini, M. Mancini, N. R. Markus, P. F. Robbins, Y. Kawakami and S. A. Rosenberg (1994). "Human CD4⁺ T cells specifically recognize a shared melanoma-associated antigen encoded by the tyrosinase gene." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(20): 9461-9465.
- Torres, M. and A. Casadevall (2008). "The immunoglobulin constant region contributes to affinity and specificity." *Trends Immunol* 29(2): 91-97.
- Van Den Herik-Oudijk, I. E., N. A. Westerdaal, N. V. Henriquez, P. J. Capel and J. G. Van De Winkel (1994). "Functional analysis of human Fc gamma RII (CD32) isoforms expressed in B lymphocytes." *J Immunol* 152(2): 574-585.
- van Deurs, B., O. W. Petersen, K. Sandvig and S. Olsnes (1989). "[Endocytosis, intracellular transport and sorting of proteins]." *Nord Med* 104(1): 9-11.
- Vidarsson, G., G. Dekkers and T. Rispens (2014). "IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions." *Front Immunol* 5: 520.

- Wiles S., Ferguson K., Stefanidou M., Young D. B., Robertson B. D. (2005) Alternative Luciferase for Monitoring Bacterial Cells under Adverse Conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 71(7): 3427-3432.
- Williams, A. F. and A. N. Barclay (1988). "The immunoglobulin superfamily-- domains for cell surface recognition." *Annu Rev Immunol* 6: 381-405.
- Wolchok, J. D., J. Yuan, A. N. Houghton, H. F. Gallardo, T. S. Rasalan, J. Wang, Y. Zhang, R. Ranganathan, P. B. Chapman, S. E. Krown, P. O. Livingston, M. Heywood, I. Riviere, K. S. Panageas, S. L. Terzulli and M. A. Perales (2007). "Safety and immunogenicity of tyrosinase DNA vaccines in patients with melanoma." *Mol Ther* 15(11): 2044-2050.
- Yamada, E. (1955). "The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse." *J Biophys Biochem Cytol* 1(5): 445-458.

Kasutatud raamatud:

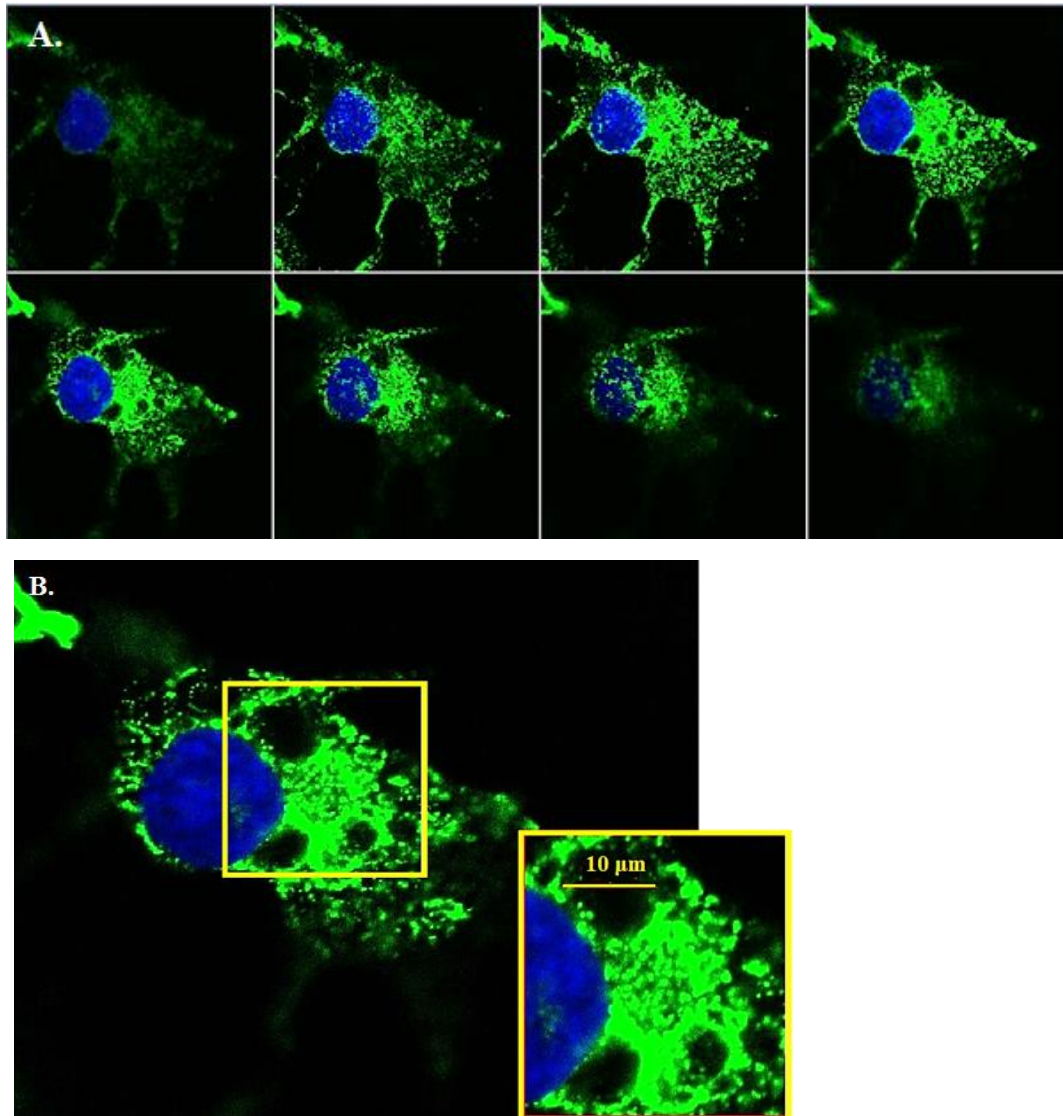
- Klaus D. Elgert. Immunoloogia õpik "Immunology: Understanding the Immune System", Chapter 1, p 1-27. (1998).
- Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter. Molekulaarbioloogia õpik "Molecular biology of the cell" (Chapter: Transport into the Cell from the Plasma Membrane: Endocytosis), 4th edition. (2002).
- Suman Kapur, Anuradha Pal, Shashwat Sharad. Immunoloogia õpik "Immunosuppression – Role in Health and Diseases" (Chapter 1: Role of Opioidergic System in Humoral Immune Response. (2012).
- E. Holtzman, Lysosomes: A Survey (Cell Biology Monographs.(Chapter 2.3.2.4. Effects of low Temperature on Receptor-Mediated Endocytosis and Other Forms of Pinocytosis. Continuation of Protoplasmatologia, Vol. 3. XI, 298 S., 56 Abb. Wien–New York. (1976)

Kasutatud veebilehed:

- www.kasvaja.net
- <http://findmeacure.com/2009/01/09/melanoma/>
- www.wcrf.org
- www.cancerresearchuk.org
- cancer.ee

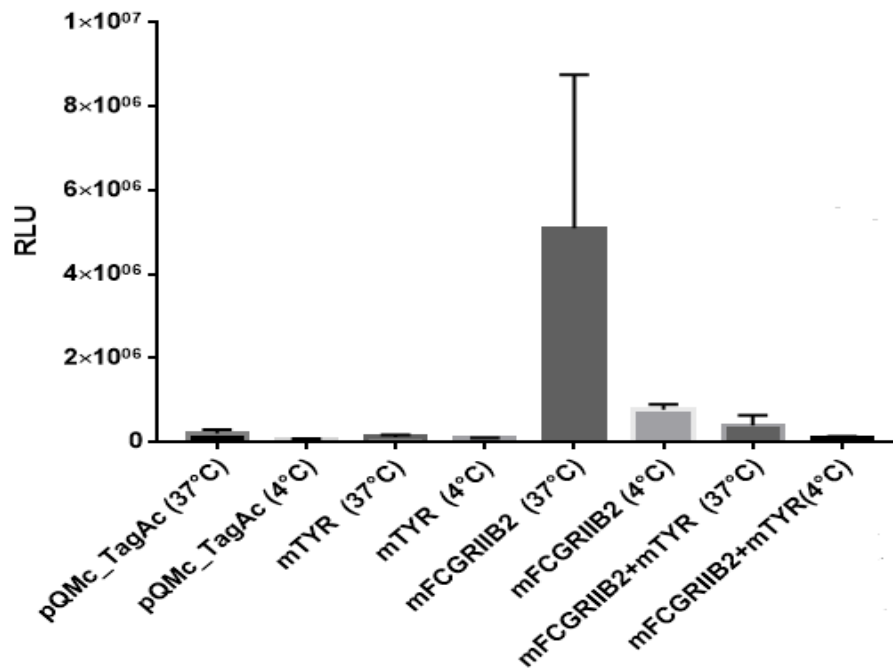
LISAD

LISA 1



Lisa 1: A) Hiire Fc γ RIIB2 retseptorit ekspresseeriva raku 8-kihiline konfokaalmikroskoobi pilt. 5A2 antikeha roheline signaal esineb nii plasmamembraanil, kui ka raku sisemuses erineva suurusega vesiiklitena. B) Pildi A. alt 5. kihi suurendus, et demonstreerida erinevate suurustega vesiikleid (pisikestest mullikestest kuni 10 μ m diameetriga).

LISA 2



Lisa 2: COS-7 rakkudega läbiviidud internalisatsiooni katsete võrdlus. 5A2 antikeha internalisatsioon on efektiivsem 37 °C juures, samal ajal kui 4 °C juures see on mitu korda väiksem. See asjaolu viitab sellele, et tegu on aktiivse transpordiga.

Lihthitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Oksana Gerulis

(sünnikuupäev 06.09.1990)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihthitsentsi) enda loodud teose

„Melanoomi antigeeni türosinaasi vastase antikeha internalisatsioonimehhanismide uurimine“

mille juhendaja on Nele Jaanson

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **25.05.2016** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihthitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 25.05.2016

